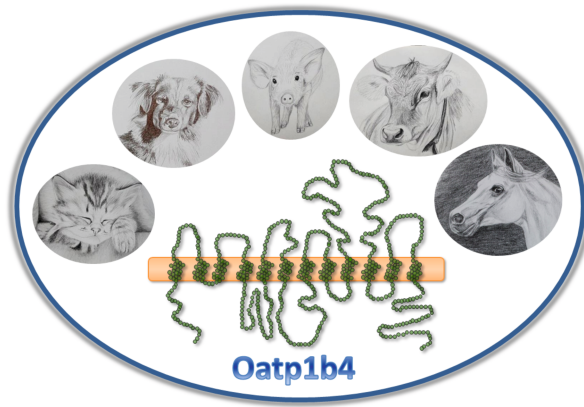


# Hepatische Arzneistofftransporter der Oatp1b-Subfamilie von Haus- und Nutztieren:

Klonierung, Polymorphismenanalyse und  
funktionelle Charakterisierung



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

# **Hepatische Arzneistofftransporter der Oatp1b-Subfamilie von Haus- und Nutztieren: Klonierung, Polymorphismenanalyse und funktionelle Charakterisierung**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Jana Bartholomeyzik**

Tierärztin aus Eberbach

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Geyer
2. Gutachter: Prof. Dr. S. Tacke

Tag der Disputation: 27. November 2017

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>III</b>
<b>1     Literaturübersicht .....</b>	<b>1</b>
1.1     Die Leber.....	1
1.1.1   Anatomie und Histologie .....	1
1.1.2   Transportsysteme an Hepatozyten .....	2
1.2     Die Familie der SLCO-Transporter.....	6
1.3     Die humanen Lebertransporter OATP1B1 und OATP1B3 .....	10
1.3.1   Vorkommen und Struktur.....	10
1.3.2   Funktion und Substratspektrum .....	11
1.3.3   Polymorphismen und ihre funktionellen Auswirkungen .....	12
1.4     Die Oatp1b-Subfamilie in der Leber verschiedener Tierarten .....	16
1.5     Der canine Oatp1b4 .....	18
1.6     Zielsetzung der Arbeit .....	20
<b>2     Material.....</b>	<b>22</b>
2.1     Polymerase-Ketten-Reaktion.....	22
2.1.1   Eingesetzte Primer .....	22
2.1.2   Enzyme.....	23
2.2     Vektoren .....	25
2.2.1   pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO Vektor .....	25
2.2.2   pOG44 Vektor .....	25
2.3     Bakterienstämme.....	26
2.4     Quantitative <i>Real-Time PCR</i> .....	26
2.4.1   TaqMan Gene Expression Assays .....	26
2.4.2   TaqMan Universal PCR .....	26
2.5     Längenstandards .....	27
2.6     Kommerziell erhältliche Kits und Materialien für die Molekularbiologie .....	27

2.7	Puffer und Medien .....	27
2.8	Native Gelelektrophorese .....	28
2.9	Zellkultur.....	28
2.9.1	Zelllinien.....	28
2.9.2	Medien.....	29
2.9.3	Antibiotika.....	30
2.9.4	Stabile und transiente Transfektion.....	30
2.10	Transportmessungen an eukaryotischen Zellen.....	31
2.10.1	Puffer und Lösungen.....	31
2.11	Proteinbestimmung .....	31
2.12	Xenopus laevis Oozyten .....	32
2.12.1	Versuchstiere .....	32
2.12.2	Puffer und Lösungen.....	32
2.13	Immunfluoreszenz .....	33
2.13.1	Puffer und Medien .....	33
2.14	Proteinanalyse .....	34
2.14.1	Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	34
2.14.2	Puffer und Lösungen für Western Blot.....	34
2.14.3	Filmentwicklung .....	35
2.14.4	Längenstandards .....	35
2.14.5	Kommerziell erhältliche Kits und Materialien für die Proteinanalyse .....	36
2.15	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe .....	36
2.16	Chemische Substanzen.....	37
2.16.1	Reagenzien .....	37
2.16.2	Feinchemikalien.....	39
2.17	Radioaktiv-markierte Substanzen .....	39
2.18	Geräte .....	40
2.19	Verbrauchsmaterial.....	42
2.20	Bioinformatische Programme und Datenbanken.....	43

---

<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>45</b>
3.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	45
3.1.1	Native Agarose-Gelelektrophorese .....	45
3.1.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel .....	45
3.1.3	Aufreinigen von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab .....	46
3.1.4	Aufreinigung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab .....	46
3.1.5	Konzentrationsbestimmung DNA .....	47
3.1.6	Konzentrationsbestimmung RNA .....	47
3.2	Methoden zur Isolierung und Aufarbeitung von RNA .....	48
3.2.1	Probenmaterial .....	48
3.2.2	RNA Isolation aus Gewebe .....	51
3.2.3	RNA Isolation aus Zellen .....	51
3.2.4	DNase-Verdau .....	52
3.2.5	RNA-Aufreinigung .....	52
3.2.6	RNA-Quantifizierung mittels <i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i> .....	53
3.2.7	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA .....	54
3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	55
3.3.1	Allgemeine Regeln zur Primerauswahl .....	55
3.3.2	PCR-Reaktionsansatz .....	56
3.3.3	Touchdown-PCR .....	57
3.3.4	Nested-PCR Oatp1b4 des Hundes .....	58
3.3.5	Kolonie-PCR .....	58
3.3.6	PCR zur Generierung von 3'-A-Überhängen .....	59
3.3.7	Zielgerichtete Mutagenese .....	59
3.3.8	Quantitative <i>Real-Time PCR</i> .....	61
3.4	DNA-Klonierung .....	63
3.4.1	TOPO-Klonierung .....	63
3.5	Transformation .....	63
3.6	Sequenzierung und Auswertung von Sequenzspuren .....	64
3.7	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	64
3.7.1	Passagieren der Zellen .....	65
3.7.2	Aussähen der Zellen .....	65

3.7.3	Kryokonservierung der Zellen .....	65
3.7.4	Auftauen der Zellen .....	65
3.8	Transfektion eukaryotischer Zellen .....	66
3.8.1	Transiente Transfektion.....	66
3.8.2	Stabile Transfektion.....	66
3.9	Transportmessung an eukaryotischen Zellen.....	67
3.9.1	Ansetzen der Messlösungen und Vorbereitung der Zellen .....	68
3.9.2	Aufnahmeversuch .....	68
3.9.3	Flüssigkeitsszintillationsmessung.....	68
3.9.4	Proteinbestimmung.....	69
3.9.5	Auswertung der Aufnahmeversuche .....	69
3.10	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	69
3.10.1	cRNA-Synthese .....	70
3.10.2	Gewinnung der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	72
3.10.3	Mikroinjektion der cRNA .....	72
3.10.4	Transportmessungen an Oozyten .....	73
3.11	Immunfluoreszenz .....	74
3.11.1	Indirekte Immunfluoreszenz mit dem <i>Maus anti-V5-Antikörper</i> .....	74
3.11.2	Mikroskopie.....	76
3.12	Western Blot .....	76
3.12.1	Proteinextraktion mit <i>RIPA-Puffer</i> .....	76
3.12.2	Proteinextraktion mit Proteo Extract Native Membrane Protein Extraction Kit.. .....	77
3.12.3	Proteinbestimmung mittels <i>BCA Protein Assay Kit</i> .....	77
3.12.4	Gellauf und Blotting.....	78
3.12.5	Blockierung der Membran und Antikörperreaktion .....	79
3.12.6	Detektion .....	79
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
4.1	Der canine Oatp1b4-Transporter .....	81
4.1.1	Polymorphismen im cfOatp1b4-Transporter .....	81
4.1.2	Expressionsunterschiede des caninen Oatp1b4-Transporters in der Leber .....	86
4.1.3	Funktionelle Charakterisierung des caninen Oatp1b4 im Zellkulturmodell .....	89

---



---

4.1.4	Etablierung der stabil transfizierten cfOatp1b4-WT-, cfOatp1b4*- und rOatp1b2-Zelllinien .....	92
4.1.5	Funktionelle Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien .....	93
4.1.6	Nachweis des caninen Oatp1b4-Proteins.....	94
4.1.7	Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	98
4.2	Die Oatp1b-Subfamilie anderer Tierarten.....	100
4.2.1	Sequenzanalyse der Oatp1b-Subfamilie bei verschiedenen Tierarten.....	100
4.2.2	Funktionelle Charakterisierung der Oatp1b-Transporter verschiedener Tierarten .....	101
4.2.3	Nachweis der Oatp1b-Proteine mit dem <i>Maus anti-V5</i> Antikörper .....	102
4.3	Funktionelle Charakterisierung des bovinen Oatp1b4 .....	105
4.3.1	Substrataufnahme vergleichend zu OATP1B1 und OATP1B3 .....	105
4.3.2	Zeitabhängigkeit.....	106
4.3.3	Kinetik der btOatp1b4-vermittelten Aufnahme .....	107
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>109</b>
5.1	Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse der OATP1B-Mitglieder .....	109
5.2	Der canine Oatp1b4-Transporter .....	112
5.2.1	Screening der Hundeproben auf Polymorphismen im Oatp1b4-Transporter ..	112
5.2.2	Expression des caninen Oatp1b4 .....	114
5.2.3	Funktionelle Charakterisierung der cfOatp1b4-Varianten.....	116
5.3	Der bovine Oatp1b4-Transporter .....	123
5.4	Die Oatp1b-Transporter weiterer Tierarten.....	124
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>130</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>144</b>
<b>10</b>	<b>Danksagungen.....</b>	<b>148</b>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Schematische Darstellung verschiedener Möglichkeiten der Einteilung des Lebergewebes.....	2
Abb. 1.2: Transportsysteme an Hepatozyten .....	3
Abb. 1.3: Graphische Darstellung von OATP1B1 und OATP1B3 .....	11
Abb. 1.4: Phylogenetischer Baum von Mitgliedern der SLCO1B/Slco1b-Subfamilie verschiedener Tierarten .....	16
Abb. 2.1: Schematische Darstellung des <i>pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO</i> Vektors .....	25
Abb. 2.2: Schematische Darstellung des <i>pOG44</i> Vektors.....	25
Abb. 3.1: Darstellung des Elektropherogramms einer RNA nach Isolierung aus einer Leberbiopsie mit Hilfe des <i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i> .....	54
Abb. 3.2: Prinzip der qualitativen <i>Real-Time PCR</i> mit dem TaqMan System. ....	62
Abb. 3.3: Darstellung einer Sequenzspur mit dem Programm <i>FinchTV</i> .....	64
Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Mikroinjektion von cRNA in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	73
Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Proteinnachweises mittels Fluoreszenz-markiertem Antikörper.....	75
Abb. 3.6: Schematischer Aufbau des <i>Semi-Dry</i> Elektroblobs .....	78
Abb. 4.1: Darstellung der PCR-Produkte des cfOatp1b4 mittels Agarose-Gelelektrophorese	82
Abb. 4.2: Schematische Darstellung eines <i>Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP)</i> mit 12 Transmembrandomänen.....	83
Abb. 4.3: graphische Darstellung der SNPs 693 A>G und 1186 A>G im caninen Oatp1b4 .....	84
Abb. 4.4: Virtuelles Gelbild von RNA Proben, generiert vom <i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i> .....	87
Abb. 4.5: Relative Expression des caninen Oatp1b4 in Relation zu den Kontrollgenen $\beta$ -Actin (A) und B <sub>2</sub> M (B) unter Verwendung des <i>TaqMan Assays Cf02624370_m1</i> .....	88
Abb. 4.6: Dot-Blot-Darstellung der $\Delta C_T$ -Werte des caninen Oatp1b4 in Relation zu den Kontrollgenen $\beta$ -Actin und B <sub>2</sub> M.....	88
Abb. 4.7: Aufnahmestudien in transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen.....	90
Abb. 4.8: Aufnahmestudien in transient transfizierten CHO-Zellen, HepG2-Zellen und MDCK-Zellen .....	91
Abb. 4.9: Aufnahmestudien in transient transfizierte GripTite MSR-Zellen unter Verwendung von <i>Lipofectamine 2000</i> und <i>FuGENE HD</i> als Transfektionsreagenz.....	92

Abb. 4.10: Relative Expression der mit cfOatp1b4* und cfOatp1b4-WT stabil transfizierten FlpIn-HEK293-Zellen in Relation zu den Kontrollgenen hGAPDH (A) und hACTB (B) .....	93
Abb. 4.11: Zwei unabhängige Transportstudien der stabil transfizierten Oatp1b-HEK293-Zelllinien .....	94
Abb. 4.12: Immunfluoreszenz der mit cfOatp1b4-WT, cfOatp1b4* und rOatp1b2 transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen.....	95
Abb. 4.13: Immunfluoreszenz der mit cfOatp1b4-WT, cfOatp1b4* und rOatp1b2 transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen in 40-fache Vergrößerung .....	96
Abb. 4.14: Immunfluoreszenz der mit den Oatp1b-Varianten von Ratte und Hund transient transfizierten MDCK-Zellen .....	97
Abb. 4.15: <i>Western Blot</i> Analyse der mit cfOatp1b4-WT, cfOatp1b4* und rOatp1b2 transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zelllinien .....	98
Abb. 4.16: Transportstudien mit radioaktiv-markiertem E <sub>1</sub> S, BSP, CCK8, TC und Digoxin in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	99
Abb. 4.17: Aufnahme von [ <sup>3</sup> H]BSP in <i>X. laevis</i> Oozyten in Abhängigkeit von der Zeit .....	100
Abb. 4.18: Darstellung von PCR-Produkten der Oatp1b-Varianten von Ratte, Schwein, Pferd, Katze, Rind, Huhn und Maus mittels Agarosegelelektrophorese.....	101
Abb. 4.19: Transportexperimente mit rOatp1b2, btOatp1b4, susOatp1b4, equOatp1b4 und fcOatp1b4 in transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen .....	102
Abb. 4.20: Immunfluoreszenz der mit den Oatp1b-Varianten von Ratte, Rind, Pferd und Schwein transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen.....	103
Abb. 4.21: <i>Western Blot</i> Analyse von rOatp1b2 sowie Oatp1b4 von Rind, Schwein und Pferd .....	104
Abb. 4.22: Aufnahmestudien mit BSP, E <sub>1</sub> S, CCK8 und TC in mit OATP1B1, OATP1B3, rOatp1b2 und btOatp1b4 transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen .....	106
Abb. 4.23: Zeitabhängige Aufnahme von [H <sup>3</sup> ]E <sub>1</sub> S über rOatp1b2 und btOatp1b4 in transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen.....	107
Abb. 4.24: Konzentrationsabhängige Aufnahme von E <sub>1</sub> S über btOatp1b4 und rOatp1b2 in GripTite 293 MSR-Zellen .....	108
Abb. 5.1: Aminosäuren-Sequenzalignment der Oatp1b-Proteine verschiedener Spezies ....	112
Abb. 5.2 Darstellung der <i>Kozak</i> -Sequenz und die Sequenzabfolge einiger OATP1B/Oatp1b-Transporter. ....	120

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1: Auflistung der humanen OATPs und ihre Gewebeverteilung. ....	9
Tab. 1.2: Bislang bekannte Polymorphismen in OATP1B1 .....	14
Tab. 1.3: Bislang bekannte Polymorphismen in OATP1B3 .....	15
Tab. 3.1: Übersicht über die 48 Leberbiopsieproben von Hunde und Katzen, welche in dieser Arbeit untersucht wurden. ....	49
Tab. 4.1: Sequenzauswertung der untersuchten Leberbiopsie-Proben von 44 Hunden.....	85
Tab. 5.1: Aminosäureidentität der Oatp1b-Proteine der verschiedenen Spezies in % .....	109

## ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACTB	B-Aktin
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
b	Base
B <sub>2</sub> M	B-2-Microglobulin
BCA	Bicinchoninic acid, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
bq	Bequerel
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	Bromosulphophthalein
bzw.	beziehungsweise
C-	Kohlenstoffatom
ca.	circa
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK8	Cholecystokinin 8
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese hamster ovary
Ci	Curie
CMV	Cytomegalievirus
cpm	counts per minute
cRNA	complementary RNA
C <sub>T</sub>	signal threshold cycle
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol Dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dpm	Disintegration per minute (Zerfall pro Minute)
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
<i>E. coli</i>	Escherichia coli

## ABKÜRZUNGEN

---

E <sub>1</sub> S	Estron-3-Sulfat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et. al.	et alii, et aliae, et alia, und andere
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FKS	fetales Kälberserum
FRT	Flp Recombinase Target
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOI	gene of interest
h	Stunde
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HUGO	Human Genome Organisation
IC <sub>50</sub>	Hemmstoffkonzentration, welche die Aufnahme bei einer bestimmten Substratkonzentration um 50 % hemmt
kb	kilo base pair
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug resistance-associated protein
MSR	Macrophage Scavenger Receptor
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEAA	Non Essential Amino Acid
NEB	New England Biolabs
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
NTCP	Na <sup>+</sup> /Taurocholate Cotransporting Polypeptide
OATP	Organic anion transporting polypeptide

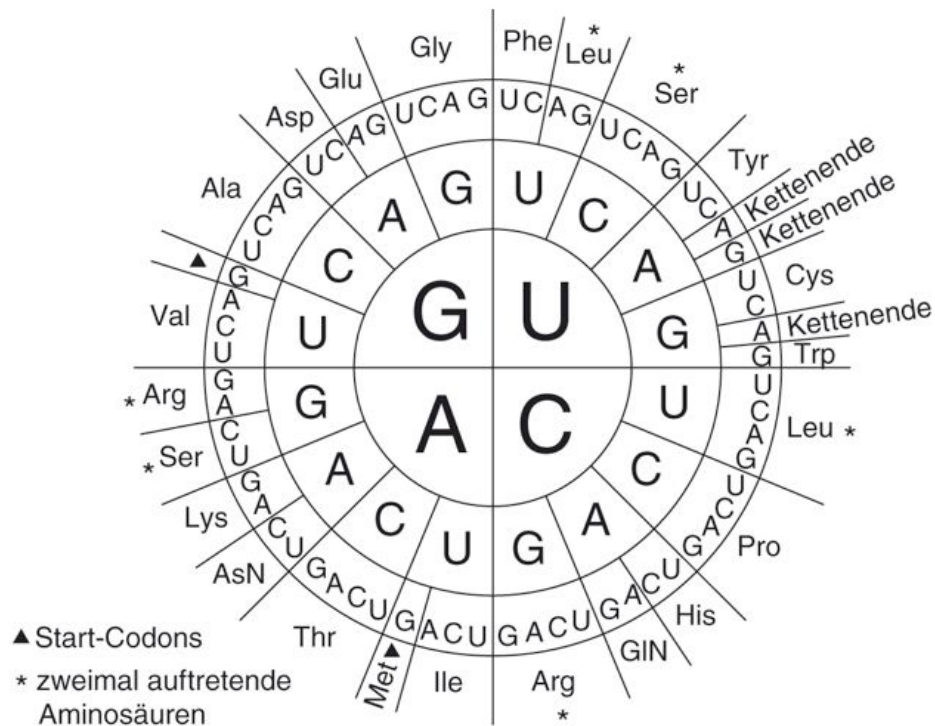
## ABKÜRZUNGEN

---

OD	Optische Dichte
ORF/orf	Open reading frame, offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionenkonzentration
PolyA	Polyadenylierungssequenz
qPCR	Quantitative PCR
RIN	RNA Integrity Number
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
rpm	rotations per minute (Umdrehung pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SLC	Solute Carrier
SLCO	Genbezeichnung der organic anion transporting polypeptides
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris buffered saline with Tween, Tris gepuffertes NaCl mit Tween Zusatz
TC	Taurocholat
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
$T_m$	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UTR	Untranslated region, untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
$V_{\max}$	maximale Aufnahmegeschwindigkeit
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin





# 1 LITERATURÜBERSICHT

## 1.1 Die Leber

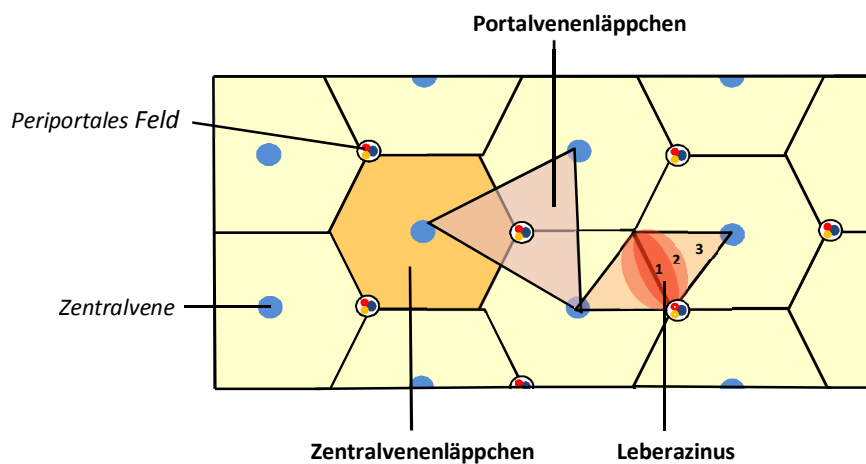
Die Leber ist das Hauptstoffwechselorgan im Körper (Engelhardt und Breves 2000). Über die Pfortader gelangen aus dem Darm resorbierte Anteile der Nährstoffe in die Leber, wo sie metabolisiert oder auch gespeichert werden. Im Rahmen der Biotransformation ist die Leber auch in der Lage schädliche Substanzen abzubauen und zu entgiften oder auch in einigen Fällen eine Giftung durchzuführen. Durch die Bildung von Galle, welche in der Gallenblase gespeichert und in den Dünndarm abgegeben wird, ist die Leber auch an der intestinalen Fettverdauung beteiligt.

### 1.1.1 Anatomie und Histologie

Die Leber ist je nach Tierart in eine verschiedene Anzahl von Leberlappen unterteilt. Die Blutversorgung wird durch sauerstoffreiches Blut aus der *Arteria hepatica* und nährstoffreiches Blut aus der *Vena portae* sichergestellt. Beide Gefäße verzweigen sich innerhalb der Leber immer weiter, bis sie schließlich in die Lebersinusoide münden und das Blut über die *Vena centralis* in die *Vena cava caudalis* abgeleitet wird (König und Liebich 2005).

Abhängig von strukturellen oder funktionellen Charakteristika gibt es für das Lebergewebe drei Gliederungsmöglichkeiten: Zentralvenenläppchen, Portalvenenläppchen und Leberazinus (Abb. 1.1). Die Zentralvenenläppchen sind durch eine mittig gelegene *Vena centralis* gekennzeichnet und sind voneinander durch Bindegewebe getrennt. Die Hepatozyten sind in zentral zulaufenden Balken angeordnet. Ihre basolaterale Membran ist den Sinusoiden zugewandt und von diesen durch den Disse'schen Raum getrennt. Dort befinden sich Fibroblasten, Kollagen und Ito-Zellen. In der Wand der Sinusoide sind des Weiteren Kupffersche-Sternzellen (Lebermakrophagen) lokalisiert. Die apikale Membran der Hepatozyten begrenzen die Gallencanaliculi. Bei der Einteilung in Portalvenenläppchen befindet sich in der Mitte ein periportales Feld mit Arterie, Vene und Gallengang (Glisson-Trias), die Ecken des entstehenden Dreieckes bilden die Zentralvenen. Somit umfasst ein Portalvenenläppchen Anteile von drei Zentralvenenläppchen. Im Vordergrund dieser Einteilung steht die exokrine Funktion der Leber. Im Zentrum des Leberazinus stehen die

zwischen zwei Zentralvenenläppchen gelegenen Äste der interlobulären Vene und Arterie, welche von einem kleinen Gallengang, Lymphgefäß und vegetativen Nerven begleitet werden. Die rhombische Gestalt wird durch die Verbindung zu den Zentralvenen der benachbarten Zentralvenenläppchen erzielt. Es erfolgt die Einteilung des Leberazinus in drei Zonen. Zone 1 entspricht der im Zentrum des Rhombus gelegenen Zone, welche einen relativ hohen Nährstoff- und Sauerstoffgehalt aufweist. In der angrenzenden intermediär gelegenen Zone 2 nimmt der Sauerstoff- und Nährstoffgehalt bereits ab, sodass in Zone 3 der Sauerstoffgehalt auf den Wert einer Vene abgesunken ist. Der Nährstoffgehalt ist hier ebenso gering, wohingegen viele Metaboliten anzutreffen sind, da hier ein wesentlicher Anteil der Entgiftung erfolgt.



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung verschiedener Möglichkeiten der Einteilung des Lebergewebes.**

Das sechseckige Zentralvenenläppchen ist durch eine mittig gelegene Zentralvene gekennzeichnet. Im Zentrum der Portalvenenläppchen liegt ein periportales Feld mit Glisson-Trias. Die rhombische Gestalt des Leberazinus ist in 3 Zonen unterteilt mit abnehmender Sauerstoffversorgung von Zone 1 zu Zone 3.

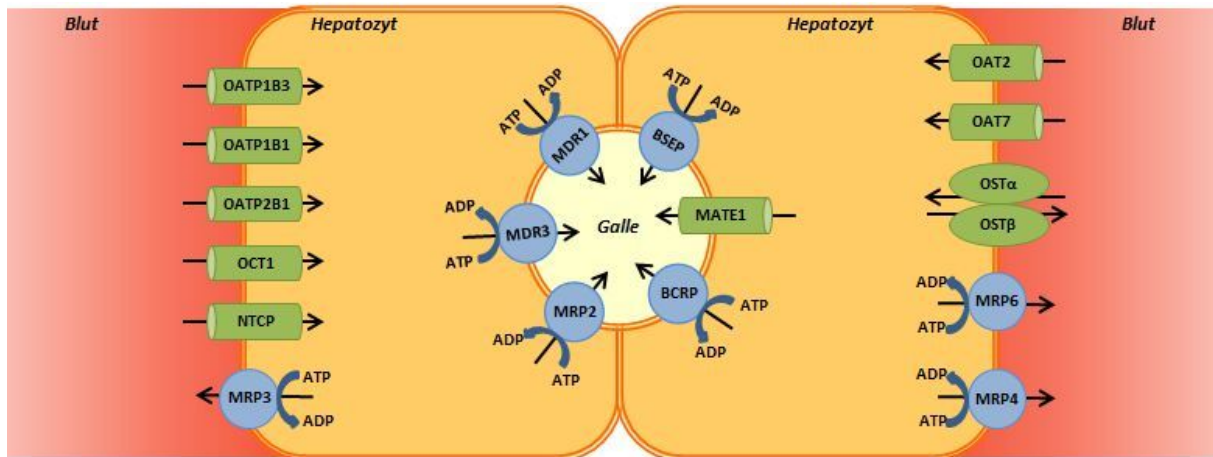
Die von den Hepatozyten gebildete Galle wird über ein intra- und extrahepatisches Gangsystem zunächst in die Gallenblase und von dort über den *Ductus choledochus* weiter in das Duodenum geleitet. Als Besonderheit beim Pferd und der Ratte ist die fehlende Gallenblase zu erwähnen (König und Liebich 2005).

### 1.1.2 Transportsysteme an Hepatozyten

In der Leber kann die Biotransformation, welche zum Großteil zur Metabolisierung und Eliminierung körpereigener Stoffe sowie Xenobiotika dient, in vier Phasen unterteilt werden. Die Aufnahme von Substanzen in die Hepatozyten, zumeist vermittelt durch Transportproteine, wird als Phase 0 bezeichnet (Petzinger und Geyer 2006). Phase I und II finden innerhalb der Zelle statt und wurden bereits 1959 von Williams definiert. So stellt

Phase I die Oxidation, Reduktion und Hydrolyse der Substanzen dar, wohingegen Phase II die Synthese bzw. Konjugation bezeichnet (Williams 1959; Gillette 1963). Als Phase III wird letztendlich die Elimination der Substanzen, welche teilweise Phase I und II durchlaufen haben, verstanden (Ishikawa 1992).

Nachfolgend soll ein kurzer Überblick über die Transportsysteme der Phase 0 und der Phase III beim Menschen gegeben werden.



**Abb. 1.2: Transportsysteme an Hepatozyten**

An der blutzugewandten (basolateralen) Membran sind sowohl Transporter für die Aufnahme von Substanzen in die Hepatozyten (OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OCT1, NTCP, OAT2, OAT7), als auch für den Efflux (MRP3, MRP4, MRP6) vorzufinden. OSTα und OSTβ sind vorwiegend für den Efflux zuständig, in deutlich geringerem Umfang jedoch auch für die Aufnahme von Substanzen. An der apikalen Membran sind für die Eliminierung in die Galle MDR1 und MDR3, MRP2, BSEP, BCRP und MATE1 exprimiert.

#### 1.1.2.1 Basolaterale (sinusoidale) Membran

Die Transporter in der basolateralen Membran der Hepatozyten sind für die Aufnahme von Substanzen aus dem Blut in die Zellen verantwortlich. Mehrere Transportproteine wurden hier inzwischen beschrieben. Der NTCP (*Na<sup>+</sup>/Taurocholate Cotransporting Polypeptide*) vermittelt die natriumabhängige Aufnahme von Gallensäuren, Steroidsulfaten und einigen Xenobiotika (Hagenbuch et al. 1991; Boyer et al. 1994; Hagenbuch und Meier 1994). Er gehört der SLC10-Familie an und besitzt sieben Transmembrandomänen mit extrazellulär gelegenen N-Terminus und intrazellulär gelegenen C-Terminus (Hagenbuch et al. 1991; Hagenbuch und Meier 1994).

Weitere Vertreter der SLC-Superfamilie sind Mitglieder der SLC22-Familie, die *Organic Anion Transporter* OAT2 und OAT7 sowie die *Organic Cation Transporter* OCT1 und OCT2. OAT2 ist vorwiegend in der Leber lokalisiert, in deutlich geringerer Ausprägung jedoch auch in der Niere vorzufinden (Sekine et al. 1998; Sun et al. 2001). OAT7 hingegen ist leberspezifisch

(Shin et al. 2007). Der OAT-vermittelte Transport ist natriumunabhängig. Substrate von OAT2 sind unter anderem Prostaglandine und Glutarat, als auch die exogenen Substanzen Methotrexat und Allopurinol (Sun et al. 2001; Kobayashi et al. 2002). Für OAT7 konnte ein Transport von Estron-3-sulfat ( $E_1S$ ) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) gezeigt werden (Burckhardt 2012). Auch der Transport der OCTs ist natriumunabhängig (Koepsell und Endou 2004). Die Substrate sind von eher niedrigem Molekulargewicht und besitzen eine positive Ladung.

Aus der Familie der SLCO-Transporter sind OATP1B1 und OATP1B3 leberspezifisch in der basolateralen Membran lokalisiert (Abe et al. 1999; Hsiang et al. 1999; König et al. 2000a,b). OATP2B1 ist in mehreren Organen vertreten, die höchste Expression jedoch findet sich ebenfalls in der Leber. Die OATPs sind multispezifische Transporter, die eine Vielzahl von Substanzen als Substrate akzeptieren. Als Gegenstand dieser Arbeit, werden die OATP-Transporter im Detail in Kapitel 1.2 beschrieben.

Ebenfalls in der basolateralen Membran lokalisiert sind die *Organic Solute Transporter* OST $\alpha$  und OST $\beta$  (SLC51A1/A2) (Ballatori et al. 2005), welche jedoch im Gegensatz zu den zuvor genannten Transportern für einen natriumunabhängigen Efflux verantwortlich sind. Möglicherweise findet auch, abhängig von ihrem Konzentrationsgradienten, eine Aufnahme einzelner Substanzen statt (Ballatori 2005). Mit sieben Transmembrandomänen ist OST $\alpha$  größer als OST $\beta$  mit lediglich einer Transmembrandomäne (Wang et al. 2001; Seward et al. 2003). Um ihre Funktion ausführen zu können ist eine Co-Expression der beiden Transporter nötig (Li et al. 2007). Zu den Substraten gehören Gallensäuren,  $E_1S$ , Digoxin oder auch Prostaglandin  $E_2$  (Wang et al. 2001; Seward et al. 2003; Ballatori 2005; Ballatori et al. 2008, 2013).

Weitere Effluxtransporter an der basolateralen Membran sind die *Multidrug Resistance-Associated Proteins* MRP3, MRP4 und MRP6. Sie gehören der ATP-abhängigen *ATP-Binding Cassette* (ABC) Protein Superfamilie an. MRP3 und MRP6 besitzen drei Transmembrandomänen mit insgesamt 17 Helices. MRP4 hingegen besteht aus nur zwei Transmembrandomänen (Jedlitschky et al. 2006; Nies et al. 2008; Toyoda et al. 2008; Zhou et al. 2008). Sie vermitteln den unidirektionalen ATP-abhängigen Efflux von Fremdstoffmetaboliten und sind somit für die Entgiftung von exogenen, aber auch von einigen endogenen Substanzen zuständig.

### 1.1.2.2 Kanalikuläre (apikale) Membran

Ein klassischer Phase III Transporter ist das „*P-Glycoprotein*“ (P-gp) oder auch „*Multidrug-resistance Protein 1*“ (MDR1) genannt, welcher ebenfalls zur ABC-Superfamilie gehört (ABCB1). Besondere Bedeutung kommt dem MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke zu. Hier schützt MDR1 das ZNS vor schädlichen toxischen Substanzen, indem diese sofort wieder in das Blut zurück gepumpt werden (Löscher und Potschka 2002; Agarwal et al. 2011). In der Leber ist MDR1 an der Eliminierung von Substanzen über die apikale Membran in die Galle verantwortlich (Del Moral et al. 1998; Fromm 2004). Substrate des P-gp sind lipophile oder auch amphipathische Substanzen, wie unter anderem Zytostatika, Makrozyklische Laktone oder auch Digoxin. Auch MDR3 (ABCB4) ist in Hepatozyten anzutreffen. Als Flippase führt er zur Freisetzung von Phospholipiden in die Galle, wo sie mit den Gallensäuren Mizellen bilden und so eine Schutzfunktion ausüben (Elferink et al. 1997; Oude Elferink und Paulusma 2007). Ein Vertreter der *Multidrug Resistance-Associated Proteins* ist auch an der apikalen Membran anzutreffen, nämlich der MRP2 (ABCC2) (Keppler und Kartenbeck 1996; König et al. 1999). Dieser führt ebenfalls einen auswärts gerichteten Transport durch, in diesem Fall aus den Hepatozyten in die Galle. Ebenso wie MRP3 und MRP6 besteht MRP2 aus drei Transmembrandomänen mit 17 Helices. Das Protein ist 1545 bp lang (Nies und Keppler 2007) und hat ein Molekulargewicht von 190 kDa. Zu den Substraten gehört u.a. Leukotrien C4 (Leier et al. 1994; Cui et al. 1999), Pravastatin (Niemi et al. 2006), Fexofenadin (Tian et al. 2008) sowie Cisplatin, Doxorubicin und Methotrexat (Hooijberg et al. 1999; Jedlitschky et al. 2006; Huang 2007). Das *Dubin-Johnson* Syndrom beim Menschen, bei welchem der Transport des konjugierten Bilirubins in die Galle gestört ist, geht auf einen Defekt im MRP2 zurück (Zimniak 1993; Paulusma et al. 1997).

Ein weiterer ABC-Transporter an der apikalen Membran der Hepatozyten ist das *Breast Cancer Resistance Protein* BCRP (ABCG2). Mit seiner N-terminalen ATP-bindenden Domäne und einer C-terminalen transmembranären Domäne mit nur sechs Transmembranhelices, wird er auch als Halbtransporter bezeichnet (Wang et al. 2008a). Erst durch Oligomerbildung ist seine Funktion gewährleistet (Xu et al. 2004; Mo und Zhang 2012). Neben der Elimination von Substanzen aus den Hepatozyten in die Galle, ist der BCRP auch an der Ausschüttung von Riboflavin und Xenobiotika in die Milch verantwortlich (Merino et al. 2005; van Herwaarden et al. 2007). Des Weiteren hat er auch eine Schutzfunktion in der Blut-Hirn-Schranke (Poller et al. 2010).

Der BSEP Transporter (*Bile Salt Export Pump*) (ABCB11) wird aufgrund seiner Verwandtschaft auch als „*sister of P-glycoprotein*“ bezeichnet (Stieger und Meier 1998). Zu den Substraten zählen Gallensäuren, Glutathion und Glucuronsäurekonjugate (Gerloff et al. 1999).

Ein weiterer Vertreter der SLC-Superfamilie, der jedoch an der apikalen Membran lokalisiert ist und hier als Effluxtransporter fungiert, ist MATE1 (*Multidrug and Toxin Extrusion Transporter 1*) (SLC47A1) (Otsuka et al. 2005; Masuda et al. 2006; Meyer zu Schwabedissen et al. 2010). Dieser transportiert Kationen in einem protonenabhängigen Antiport (Otsuka et al. 2005; Terada et al. 2006; Yokoo et al. 2007; Chen et al. 2007).

## 1.2 Die Familie der SLCO-Transporter

Die *Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATPs) stellen Transportproteine für eine Vielzahl von endogenen und exogenen Substanzen dar. Sie sind in Organen wie Niere, Leber, Gehirn und Darm lokalisiert. Bei einer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von über 40 % werden sie einer Familie zugeteilt. Eine weitere Unterteilung erfolgt bei einer Übereinstimmung von mehr als 60 % in Subfamilien (Hagenbuch und Meier 2004). Somit ergibt sich folgende Nomenklatur:

- Abkürzung der Superfamilie (OATP)
- Unterteilung der Familien mittels arabischer Ziffer (z. B. OATP1, OATP2 etc.)
- Unterteilung der Subfamilien mittels Buchstaben (z. B. OATP1A, OATP1B etc.)
- Einzelne Proteine werden mittels arabischer Ziffern chronologisch ihrer Entdeckung bezeichnet (z. B. OATP1B1, OATP1B3 etc.)

Für das entsprechende Gen, wird die Abkürzung SLCO in Anlegung an die SLC-Superfamilie verwendet. Während die humanen OATPs durchgehend in Großbuchstaben dargestellt werden, finden bei anderen Arten nach initialem Großbuchstaben Kleinbuchstaben Verwendung (z.B. Oatp1b2).

Mittels funktioneller Expressionsklonierung wurde 1994 der erste Oatp aus der Rattenleber isoliert (rOatp1a1). Messungen zeigten einen natriumunabhängigen Transport von Bromosulphophthalein (BSP), Taurocholat (TC) und Cholat (Jacquemin et al. 1994). In den folgenden Jahren wurden weitere Transporter identifiziert und der OATP-Familie zugeordnet. Funktionelle Untersuchungen von rOatp1a1 (Bossuyt et al. 1996a), rOatp1a4 (Noe et al. 1997) und OATP1A2 (Bossuyt et al. 1996) zeigten bereits das weite

Substratspektrum und gaben einen Hinweis auf die große Bedeutung der OATPs im Transport von Xenobiotika. Bis heute sind mehr als 300 Mitglieder der OATP/SLCO-Superfamilie identifiziert, 11 davon beim Menschen (Hagenbuch und Stieger 2013). OATPs/Oatps haben eine einheitliche Struktur aus 12 Transmembrandomänen und intrazellulär gelegenen C- und N-terminalen Enden (Jacquemin et al. 1994; Kullak-Ublick et al. 1995; Wang et al. 2008). Die zweite und fünfte extrazelluläre Schleife beinhaltet jeweils zahlreiche N-Glykosylierungsstellen. Zusätzlich sind in der fünften extrazellulären Schleife viele konservierte Cysteine anzutreffen, welche sich als wichtige Komponenten bei der Oberflächenexpression von OATP2B1 erwiesen (Hanggi et al. 2006).

Das Substratspektrum der OATPs ist breit gefächert. Sie scheinen vorwiegend amphipathische Moleküle mit einem molekularen Gewicht von mehr als 350 Da zu transportieren (Roth et al. 2012), ebenso Albumin-gebundene Substanzen wie Bilirubin. So zählen unter anderem Gallensäuren, konjugierte Steroide und Schilddrüsenhormone zu den endogenen Substraten der OATPs. Zahlreiche Medikamente wie z.B. Statine, Sartane, Antibiotika, ACE-Hemmer und Zytostatika werden ebenfalls von OATPs transportiert. Der Transportmechanismus im Detail ist bisher nicht bekannt.

Die **OATP1-Familie** beinhaltet vier humane Mitglieder, OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 und OATP1C1, deren Gene in einem Cluster auf Chromosom 12 liegen (Hagenbuch und Meier 2003).

OATP1A2 zeigte die höchste mRNA Expression in Gehirn, Leber, Lunge, Niere und Hoden (Kullak-Ublick et al. 1995). Auch im Duodenum konnte OATP1A2 nachgewiesen werden (Glaeser et al. 2007). Das Substratspektrum umfasst unter anderem die Gallensäuren Cholat, Taurocholat, Glycocholat, Taurochenodeoxycholat und Tauroursodeoxycholat (Kullak-Ublick et al. 1995), Steroidhormone und ihre Konjugate (Bossuyt et al. 1996) und Schilddrüsenhormone (Friesema et al. 1999; Fujiwara et al. 2001).

OATP1B1 und OATP1B3 sind spezifisch in der Leber lokalisiert. Einzelheiten zu Vorkommen, Funktion und Substratspektrum dieser beiden Transporter werden ausführlich in Kapitel 1.3 beschrieben.

OATP1C1 wurde aus einer Gehirn cDNA Bank isoliert und kloniert (Pizzagalli et al. 2002). Neben der Lokalisation im Gehirn konnte OATP1C1 auch in den Leydig Zellen des Hodens nachgewiesen werden (Pizzagalli et al. 2002). Das Substratspektrum ist nicht so weit gefächert wie bei den anderen Vertretern der OATP1-Familie. Neben den klassischen OATP-Substraten BSP, E<sub>1</sub>S und Estradiol-17 $\beta$ -glucuronid (E<sub>2</sub>17G) werden vor allem die



Schilddrüsenhormone Thyroxin (T<sub>4</sub>) und Reverse-Triiodthyronin (rT<sub>3</sub>) mit hoher Affinität transportiert (K<sub>m</sub> für T<sub>4</sub> = 90 nM; K<sub>m</sub> für rT<sub>3</sub> = 130 nM) (Pizzagalli et al. 2002).

Die **OATP2-Familie** beinhaltet zwei humane Mitglieder: OATP2A1 und OATP2B1.

OATP2A1 wurde zuerst aus der Niere kloniert (Lu et al. 1996). Eine mRNA Expression konnte anschließend in nahezu allen Organen nachgewiesen werden, mit der höchsten Expression in Herz, Skelettmuskulatur und Pankreas (Schuster 2002; Nomura et al. 2004; Roth et al. 2012). Funktionelle Studien zeigten einen Transport von Prostaglandinen und anderen Eicosanoiden (Nomura et al. 2004, 2005).

OATP2B1 ist ebenfalls in vielen Organen exprimiert (Tamai et al. 2000; Kullak-Ublick et al. 2001). Die höchste Expression ist in der Leber zu finden (Kullak-Ublick et al. 2001). Ebenso wie OATP1B1 und OATP1B3 ist OATP2B1 in der basolateralen Membran der Hepatozyten lokalisiert. Des Weiteren konnte OATP2B1 in Plazenta (St.-Pierre et al. 2002), Herz (Grube et al. 2006), Skelettmuskulatur (Knauer et al. 2010), Blut-Hirn-Schranke (Bronger et al. 2005), Milchdrüse (Pizzagalli et al. 2003), Dünndarm (Kobayashi et al. 2003) und Keratinozyten (Schiffer et al. 2003) nachgewiesen werden. Im Vergleich zu anderen OATPs ist die Substratspezifität gering. Es konnte ein Transport unter anderem von BSP, E<sub>1</sub>S, DHEAS, TC, Fexofenadin und einigen Statinen gezeigt werden.

Auch OATP3A1 mRNA konnte in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, mit der höchsten Expression in Hoden, Gehirn, Herz, Lunge und Niere (Huber et al. 2007). In Hoden und Gehirn finden sich zwei Spleiß-Varianten, welche eine zellspezifische Verteilung aufweisen. OATP3A1\_v1 ist in den Keimzellen des Hodens lokalisiert, wohingegen OATP3A1\_v2 in den Sertoli Zellen exprimiert wird. Des Weiteren ist OATP3A1\_v1 in der basolateralen Membran des Choroidplexus und in der Neuroglia der grauen Substanz im frontalen Kortex aufzufinden, OATP3A1\_v2 in der apikalen und subapikalen Membran des Choroidplexus und in den Zellkörpern und Axonen der Neurone im frontalen Kortex (Huber et al. 2007). Funktionelle Studien wiesen unter anderem einen Transport von Prostaglandinen, Schilddrüsenhormonen und Vasopressin nach (Adachi et al. 2003; Huber et al. 2007).

Die **OATP4-Familie** beinhaltet zwei Mitglieder: OATP4A1 und OATP4C1. OATP4A1 mRNA konnte mit der höchsten Expression in Herz und Plazenta, gefolgt von Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und Pankreas nachgewiesen werden (Tamai et al. 2000; Fujiwara et al. 2001). In einer Transportstudie konnte eine Aufnahme von E<sub>1</sub>S, E<sub>2</sub>17G, Benzylpenicillin und Prostaglandin E<sub>2</sub> gezeigt werden (Tamai et al. 2000). Eine weitere Studie konnte den



Transport von Prostaglandin E2 hingegen nicht bestätigen, wohingegen T3, rT3, T4 und TC als Substrate identifiziert wurden (Fujiwara et al. 2001).

OATP4C1 wurde zunächst als Nieren-spezifischer Transporter angesehen (Mikkaichi et al. 2004). Microarray-Studien wiesen inzwischen auch eine mRNA Expression in der Leber nach (Bleasby et al. 2006). Funktionelle Studien zeigten einen Transport von cAMP, Digoxin, Methotrexate, Ouabain, T4 und T3 (Mikkaichi et al. 2004).

Zu OATP5A1 gibt es bislang nur wenige Daten. Die mRNA konnte in fetalem Gehirn, Prostata, Skelettmuskulatur und Thymus gezeigt werden (Bleasby et al. 2006). Auf Proteinebene war OATP5A1 in der Plasmamembran von Epithelzellen des *Ductus lactiferus* im Brustgewebe zu finden (Kindla et al. 2011).

Die mRNA Expression von OATP6A1 konnte vorwiegend im Hoden gezeigt werden. Des Weiteren in Milz, Gehirn und Plazenta (Suzuki et al. 2003; Lee et al. 2004). Funktionelle Studien zu dem humanen Protein liegen bislang nicht vor.

**Tab. 1.1: Auflistung der humanen OATPs und ihre Gewebeverteilung.**

<b>Proteinname</b>	<b>Genbezeichnung</b>	<b>Gewebeverteilung</b>
OATP1A2	SLCO1A2	Gehirn, Leber, Lunge, Niere, Hoden, Auge
OATP1B1	SLCO1B1	Leber
OATP1B3	SLCO1B3	Leber
OATP1C1	SLCO1C1	Gehirn, Hoden
OATP2A1	SLCO2A1	ubiquitär
OATP2B1	SLCO2B1	ubiquitär
OATP3A1	SLCO3A1	Hoden, Herz, Gehirn, Ovar
OATP4A1	SLCO4A1	ubiquitär
OATP4C1	SLCO4C1	Niere
OATP5A1	SLCO5A1	nicht vollständig geklärt
OATP6A1	SLCO6A1	Hoden

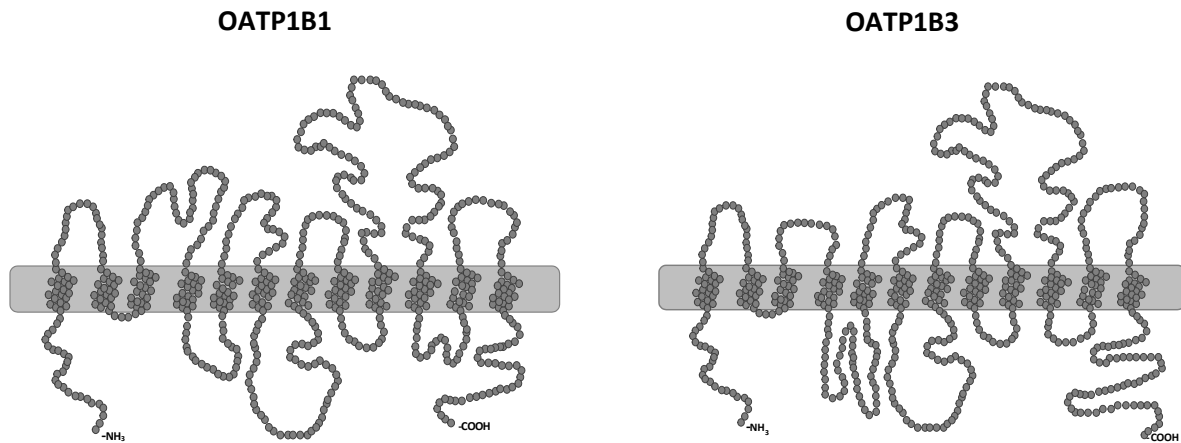
## **1.3 Die humanen Lebertransporter OATP1B1 und OATP1B3**

### **1.3.1 Vorkommen und Struktur**

OATP1B1 und OATP1B3 sind fast ausschließlich in der basolateralen Membran von Hepatozyten anzutreffen (Abe et al. 1999; Hsiang et al. 1999; König et al. 2000a,b). Während OATP1B1 eine gleichmäßige Verteilung in der Leber aufweist, ist OATP1B3 vermehrt in perivenösen Regionen exprimiert (König et al. 2000a). Zusätzlich konnte OATP1B3 in verschiedenen Tumorgeweben, wie z.B. in Mamma- (Muto et al. 2007), Lungen- (Monks et al. 2007) oder auch Prostatatumoren (Hamada et al. 2008) nachgewiesen werden.

Wie alle OATPs, weisen auch OATP1B1 und OATP1B3 die typischen, bereits in Kapitel 1.2 beschriebenen strukturellen Charakteristika auf (siehe Abb. 1.3). OATP1B1 hat eine Länge von 691 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 84 kDa, welches nach Deglykosylierung auf 58 kDa reduziert wird (König et al. 2000b). Mit 702 Aminosäuren und 120 kDa ist OATP1B3 größer und schwerer als OATP1B1. Die Aminosäuresequenzidentität beider Proteine beträgt 80 % (König et al. 2000a). Zusammen mit OATP1A2 und OATP1C1 befinden sich OATP1B1 und OATP1B3 in einem Gencluster auf Chromosom 12 (Kullak-Ublick et al. 1995; König et al. 2000a).

Die positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin scheinen für den Transport über OATP1B1 (R57, K361, K580) (Weaver und Hagenbuch 2010) und OATP1B3 (K41, R580, K361) (Glaeser et al. 2010; Mandery et al. 2011) wichtig zu sein. Bei Experimenten mit Chimären aus OATP1B1 und OATP1B3 wurden die Transmembrandomänen 8 und 9 als wichtig für den Substrattransport über OATP1B1 (Miyagawa et al. 2008) und die Transmembrandomäne 10 als bedeutend für beide Transporter (Gui und Hagenbuch 2008, 2009) identifiziert.



**Abb. 1.3: Graphische Darstellung von OATP1B1 und OATP1B3**

Sowohl OATP1B1, als auch OATP1B3 weisen den typischen Aufbau aller OATP-Transporter auf: 12 Transmembrandomänen mit intrazellulär gelegenen C- und N-Termini sowie eine große fünfte extrazelluläre Schleife. Mit 702 Aminosäuren ist OATP1B3 größer als OATP1B1 (691 Aminosäuren).

### 1.3.2 Funktion und Substratspektrum

Das exklusive Vorkommen von OATP1B1 und OATP1B3 in der Leber spricht für eine wichtige Rolle bei der hepatischen Aufnahme von endogenen und exogenen Substanzen. Die große Aminosäureidentität der beiden Transporter legt ein überlappendes Substratspektrum nahe (Kullak-Ublick et al. 2001; Kalliokoski und Niemi 2009; Fahrmayr et al. 2010). Dennoch wurden auch einige Substanzen identifiziert, welche ausschließlich von einem der beiden Transporter als Substrate erkannt werden. So werden z. B. Paclitaxel und Docetaxel von OATP1B3 transportiert, nicht jedoch von OATP1B1 (Smith et al. 2005).

Um das weitgefächerte Substratspektrum von OATP1B1 und OATP1B3 zu untersuchen wurden verschiedene Expressionsmodelle verwendet. So wurden Transportstudien an *Xenopus laevis* Oozyten, an transient als auch stabil transfizierten Zellen sowie an isolierten Hepatozyten durchgeführt. Zu den endogenen Substanzen von OATP1B1 zählen vor allem Gallensäuren, wie Cholat oder auch Glycocholat, Glycoursodeoxycholat, Taurocholat und Tauroursodeoxycholat. Unkonjugiertes und auch konjugiertes Bilirubin sind vorwiegend Substrate von OATP1B1, wobei auch für OATP1B3 ein Transport von Bilirubin gezeigt werden konnte. Für die hepatozelluläre Aufnahme von Schilddrüsenhormonen (T4 und T3) scheint OATP1B1 eine zentrale Rolle zu spielen. E<sub>1</sub>S und E<sub>2</sub>17G werden sowohl von OATP1B1 als auch von OATP1B3 transportiert.

Von den zahlreichen Medikamenten, welche über OATP1B1 und OATP1B3 in die Hepatozyten gelangen, stellen die Statine, welche als Cholesterinsenker eingesetzt werden,

die wichtigste Gruppe dar. Pravastatin war eine der ersten Substanzen aus dieser Gruppe, die als Substrat von OATP1B1 identifiziert wurde (Hsiang et al. 1999). Später stellte sich heraus, dass in der Tat alle bisher untersuchten Statine von OATP1B1 transportiert werden. Rosuvastatin, Pitavastatin und Fluvastatin wurden auch als Substrate von OATP1B3 nachgewiesen.

Eine weitere größere Gruppe nehmen die bei kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzten Medikamente ein. Hierzu zählen die ACE-Hemmer Temocapril und Enalapril, bei denen eine Aufnahme durch OATP1B1 gezeigt werden konnte, sowie das Diuretikum Torasemid. Die Angiotensin II Rezeptor Antagonisten Valsartan und Olmesartan sind sowohl für OATP1B1 als auch für OATP1B3 Substrate, wohingegen Telmisartan ein selektives Substrat von OATP1B3 zu sein scheint. Auch für eine Vielzahl von Antibiotika konnte eine Aufnahme durch OATP1B1 und/oder OATP1B3 gezeigt werden, darunter Rifampicin, Benzylpenicillin und Cefazolin. Das Antihistaminikum Fexofenadin ist für beide OATPs ein Substrat, ebenso die Zytostatika Docetaxel und Methotrexat.

Eine Auflistung aller bisher bekannter OATP1B1 und OATP1B3 Substrate unter Angabe der Referenzen und, falls vorhanden,  $K_m$ -Werten sind im Anhang verzeichnet.

Der genaue Transportmechanismus der OATPs ist bislang nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die Substanzen durch eine zentral gelegene, positiv geladene Pore in einer Art „*rocker-switch*“ Mechanismus transportiert werden (Meier-Abt et al. 2005). Der Transport ist natrium- und kaliumunabhängig. Ebenso scheint das Membranpotential und die ATP-Konzentration keinen Einfluss auf den Transportzyklus zu haben.

OATP1B1 weist für E<sub>1</sub>S eine biphasische Kinetik auf, was auf zwei Bindungsstellen schließen lässt (Tamai et al. 2001; Noe et al. 2007; Gui und Hagenbuch 2009).

### **1.3.3 Polymorphismen und ihre funktionellen Auswirkungen**

Bereits 2001 beschrieben Tirona et al. 14 nichtsynonyme Polymorphismen in OATP1B1. Hierbei wurden Proben von 42 europäisch-stämmigen Amerikanern und 22 Afroamerikanern untersucht. Für acht dieser Polymorphismen konnte eine reduzierte Transportaktivität für E<sub>1</sub>S und E<sub>2</sub>17G in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. All diese Polymorphismen waren in den transmembranären Regionen oder in der zweiten oder fünften extrazellulären Schleife zu finden. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass nicht jeder Polymorphismus zu einer veränderten Transportaktivität führt, wie der Polymorphismus 463 C>A (Tirona et al. 2001). Michalski et al. führten 2002 Studien an MDCKII-Zellen durch. Besonders auffällig war hier

bei OATP1B1\*18 (388 A>G, 463 C>A und 578 T>G) eine stark reduzierte Lokalisation in der Plasmamembran und damit verbunden ein Transportverlust für BSP, E<sub>2</sub>17G und TC. Die TC-Aufnahme von OATP1B1\*1b (388 A>G) war reduziert und bei OATP1B1\*4 (463 C>A) konnte kein Transport von Taurocholat mehr gezeigt werden (Michalski et al. 2002). Nozawa et al. führten 2002 Studien mit Probenmaterial aus der japanischen Bevölkerung durch. Hierbei entdeckten sie einen neuen Haplotyp: OATP1B1\*15 (388 A>G und 521 T>C). Dieser zeigte bei Messungen an *Xenopus laevis* Oozyten einen reduzierten Transport von Pravastatin, E<sub>1</sub>S und SN-38 (Nozawa et al. 2005). Eine vergleichende Studie von OATP1B1\*1a, \*1b, \*5 (521 T>C), \*15 zeigte in HEK293-Zellen eine reduzierte Aufnahme von Atorvastatin, Pravastatin, E<sub>1</sub>S und E<sub>2</sub>17G von OATP1B1\*5 und \*15 im Vergleich zu OATP1B1\*1a. Die Transportaktivität von OATP1B1\*1b blieb unverändert (Kameyama et al. 2005).

*In vivo* Studien mit 23 gesunden Japanern unterschiedlicher Genotypen zeigten nach einer einmaligen oralen Einnahme von 10 mg Pravastatin eine reduzierte extrarenale *Clearance* bei Personen mit OATP1B1\*1b/\*15 im Vergleich zu Personen mit OATP1B1\*1b/\*1b. Die AUC von Pravastatin bei Personen mit OATP1B1\*15/\*15 war um fast das 2-fache erhöht (Nishizato et al. 2003). Maeda et al. konnten zeigen, dass nach einer Aufnahme von 10 mg Pravastatin die AUC bei Personen mit OATP1B1\*1b/\*1b im Vergleich zu OATP1B1\*1a/\*1a um 35 % geringer war (Maeda et al. 2006). Ebenfalls mit Pravastatin führten Niemi et al. Studien mit 41 gesunden Europäern durch. Nach einer Einnahme von 40 mg Pravastatin erhöhte sich ebenfalls die AUC bei Personen mit der 521 T>C Variante (Haplotypen \*5 und \*15) (Niemi et al. 2004). Untersuchungen mit Fluvastatin, Simvastatin, Atorvastatin und Rosuvastatin folgten und lieferten ein ähnliches Bild. Der größte Effekt ließ sich bei der aktiven Form von Simvastatin feststellen (Pasanen et al. 2006, 2007).

Eine unerwünschte Arzneimittelwirkung bei der Einnahme von Statinen ist unter anderem die Statin-induzierte Myopathie. Diese kann von leichten Formen, gekennzeichnet durch Krämpfe, Schwäche und Schmerzen, bis hin zu toxischen und im schlimmsten Fall sogar tödliche Fällen reichen. Diese unerwünschte Arzneimittelwirkung wird durch eine zu hohe Plasmakonzentration der Statine verursacht, sodass schnell eine Beteiligung von OATP1B1 Polymorphismen, die zu einer verminderten Aufnahme in die Leber führen, angenommen wurde. Link et al. konnte 2008 einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anfälligkeit für die Entwicklung einer Myopathie, bei mit Statinen behandelten Patienten und dem OATP1B1\*5 Haplotyp nachweisen (Link et al. 2008).

Tab. 1.2: Bislang bekannte Polymorphismen in OATP1B1

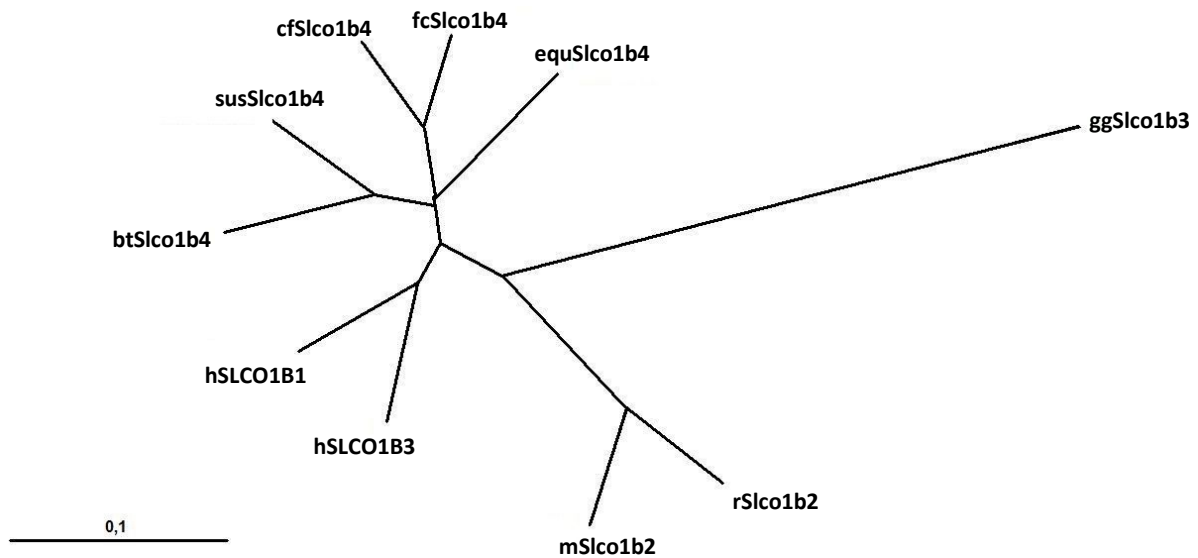
rs Nummer	Basenaustausch	Aminosäurenaustausch	Vorkommen in Allel
rs115557087	28 A>G	T10A	OATP1B1*2, *12 OATP1B1*3, *13 OATP1B1*1b, *14, *15, *17, *18, *20, *21
rs61760183	170 G>A	R57Q	
rs56101265	217 T>C	F73L	
rs56061388	245 T>C	V82A	
rs2306283	388 A>G	N130D	
rs2306282	452 A>G	N151S	OATP1B1*16
nicht bekannt	455 G>A	R152K	OATP1B1*1c
rs11045819	463 C>A	P155T	OATP1B1*4, *14, *18
rs72559745	467 A>G	E156G	OATP1B1*3, *13
rs4149056	521 T>C	V174A	OATP1B1*5, *15, *17
rs72559746	578 T>G	L193R	OATP1B1*18
nicht bekannt	601 A>G	K201E	OATP1B1*1c
rs4603354	608 G>A	G203E	
nicht bekannt	633 A>G	I211M	
rs79135870	664 A>G	I222V	
nicht bekannt	721 G>A	D241N	
rs11045852	733 A>G	I245V	
rs11045853	758 G>A	R253Q	
rs72559742	841 C>A	Q281K	
nicht bekannt	875 C>T	A292V	
rs77871475	1000 A>T	T334S	
rs72559747	1007 C>G	P336R	OATP1B1*6
rs61760245	1012T >G/A	Y338D/N	
rs79109623	1034 C>T	T345M	
rs55901008	1058 T>C	I353T	
rs59113707	1200 C>G	F400L	
rs77468276	1246 G>C	V416L	OATP1B1*7 OATP1B1*8
rs61176925	1272 A>C	L424F	
rs56387224	1294 A>G	N432D	
rs72559748	1385 A>G	D462G	OATP1B1*9
nicht bekannt	1454 G>T	C485F	
rs59502379	1463 G>C	G488A	OATP1B1*19, *20, *21 OATP1B1*10, *12 OATP1B1*11, *13
rs74064213	1495 A>G	I499V	
rs112909948	1564 G>A	G522S	
rs71581987	1622 A>T	Q541L	
rs71581988	1628 T>G	L543W	
rs74700754	1724 A>T	H575L	
rs71581941	1738 C>T	R580Stopp	
nicht bekannt	1837 T>C	C613R	
nicht bekannt	1877 T>A	L626Stopp	
rs112560099	1900 T>A	L637H	
rs34671512	1929 A>C	L643F	OATP1B1*19, *20, *21 OATP1B1*10, *12 OATP1B1*11, *13
rs56199088	1964 A>G	D655G	
rs55737008	2000 A>G	E667G	

Ausführlicher mit Polymorphismen in dem humanen OATP1B3 beschäftigten sich erstmals Iida et al. 2001, welche mehrere genetische Variationen beschrieben. Eine funktionelle Bewertung erfolgte jedoch nicht (Iida et al. 2001). Letscher et al. (2004) stellten bei den Mutationen 334 T>G und 699 G>A keine signifikanten Auswirkungen auf die Transportleistung des OATP1B3 fest. Bei 1564 G>T und 1748 T>A jedoch konnte kein Transport von Taurocholat mehr nachgewiesen werden (Letscher et al. 2004). Inzwischen sind fünfzehn *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) im OATP1B3 bekannt (Schwarz et al. 2011).

**Tab. 1.3: Bislang bekannte Polymorphismen in OATP1B3**

<b>rs Nummer</b>	<b>Basenaustausch</b>	<b>Aminosäureaustausch</b>
rs79042365	108 C>G	F36L
rs57325543	154 A>G	I52V
rs4149117	334 T>G	S112A
rs57585902	439 A>G	T147A
rs77922474	452 A>G	N151S
rs115227445	676 C>G	L226V
rs7311358	699 G>A	M233I
rs60140950	767 G>C	G256A
rs61673910	1309 G>A	G437S
rs61736817	1366 C>T	L456F
nicht bekannt	1559 A>C	H520P
rs72559743	1564 G>T	G522C
rs12299012	1679 T>C	V560A
rs76963574	1712 C>G	A571G
rs77265855	1861 T>C	F621L

## 1.4 Die Oatp1b-Subfamilie in der Leber verschiedener Tierarten



**Abb. 1.4: Phylogenetischer Baum von Mitgliedern der SLCO1B/Slco1b-Subfamilie verschiedener Tierarten**

Dargestellt sind die Verwandtschaftsverhältnisse der Mitglieder der SLCO1B/Slco1b-Subfamilie von ausgewählten Tierarten. Je weiter zwei Sequenzen auseinander liegen, desto geringer ist deren Homologie. Abgebildet sind die Sequenzen von h = *Homo sapiens* (Mensch), cf = *canis familiaris* (Hund), fc = *felis catus* (Katze), bt = *bos taurus* (Rind), equ = *equus caballus* (Pferd), sus = *sus scrofa* (Schwein), r = *rattus norvegicus* (Ratte), m = *mus musculus* (Hausmaus), gg = *gallus gallus* (Haushuhn). Es wurde ein Alignment der Sequenzen mittels *ClustalW* Algorithmus berechnet und mit Hilfe des Programms *TreeView 1.6.6.* visualisiert

Wie schon in Kapitel 1.3 erwähnt, finden sich beim Menschen zwei leberspezifische Transporter der OATP1B-Subfamilie: OATP1B1 und OATP1B3. Im Gegensatz dazu existiert bei den in dieser Arbeit untersuchten Tierarten jeweils nur ein entsprechendes Gen in der 1B-Subfamilie. Bei Ratte und Maus wird dieser Transporter Oatp1b2 (*Slco1b2*) genannt.

**Maus Oatp1b2** hat eine Sequenzhomologie von 65 % zu den humanen Transportern der OATP1B-Subfamilie. Mittels quantitativer *Real-Time PCR* konnte mRNA in Leber, Magen und Niere nachgewiesen werden, mit der höchsten Expression in der Leber. *Western Blot* Analysen bestätigten dieses Bild auf Proteinebene (Meyer zu Schwabedissen et al. 2009).

Bei Transportstudien in HeLa Zellen konnte eine signifikante Aufnahme von TC, E<sub>1</sub>S und E<sub>2</sub>17G gezeigt werden. Pravastatin und Atorvastatin sind ebenfalls Substrate des Oatp1b2. Cortisol, CCK8, Cholat, Digoxin und Fexofenadin zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen keine signifikante Aufnahme. Pacyniak et al. konnten 2011 Polybromierte Diphenylether (PBDE), welche als Flammenschutzmittel in vielen Textilien und Kunststoffen Verwendung finden, als weitere Substrate des Maus Oatp1b2 identifizieren (Pacyniak et al. 2011). Neben dem Wildtyp Oatp1b2 der Maus konnten zwei Spleiß-Varianten identifiziert werden. Bei Oatp1b2\_v2 fehlt Exon 11 und Teile von Exon 12. *In vitro* Transportstudien zeigten allerdings noch eine moderate Aufnahme von TC. Diese Variante konnte jedoch nicht in der Leber



nachgewiesen werden, sondern lediglich in Niere und Magen. Oatp1b2\_v3 stellt eine stark verkürzte Variante dar, bedingt durch ein Fehlen der Exons 5 bis 15, welche keine Transportaktivität für typische Oatp1b2 Substrate zeigte. Ein Nachweis dieser Variante in der Leber konnte ebenfalls nicht erbracht werden, stattdessen war eine Expression in der Niere nachweisbar. In Transportstudien konnte keine Aufnahme von Oatp1b2 Substraten gezeigt werden (Meyer zu Schwabedissen et al. 2009).

2008 wurde sowohl von Zaher et al., als auch von Lu et al. eine Oatp1b2(-/-) *Knockout*-Maus generiert. Für Pravastatin und Rifampicin konnte ein vermindertes Leber-zu-Plasma-Verhältnis bei den *Knockout*-Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen festgestellt werden (Zaher et al. 2008). Slco1a/1b *Knockout*-Mäuse (Fehlen sowohl der Slco1a-Gene als auch des Slco1b2-Gens) wiesen keine phänotypischen Veränderungen auf. Jedoch wurde im Serum eine leichte Erhöhung der Gallensäuren beobachtet, was die Beteiligung der Oatps bei der hepatischen Aufnahme dieser Substanzen nahe legt (van de Steeg et al. 2010). Bei genauerer Analyse konnte gezeigt werden, dass keine Erhöhung der konjugierten Gallensäuren vorlag, die unkonjugierten Gallensäuren jedoch um das 13-fache erhöht waren (van de Steeg et al. 2010). Diese Ergebnisse wurden von einer anderen Gruppe bei Mäusen mit einem inaktiven Slco1b2 Gen bestätigt (Csanaky et al. 2011). Bei beiden Versuchstiergruppen war zusätzlich eine Hyperbilirubinämie zu beobachten, welche vorwiegend auf Bilirubinmonoglucuronid und -biglucuronid und zu deutlich geringerem Anteil auf unkonjugiertem Bilirubin beruht (Zaher et al. 2008; Lu et al. 2008; van de Steeg et al. 2010; Csanaky et al. 2011). Diese Studien legen nahe, dass unter normalen Konditionen eine Wiederaufnahme von konjugiertem Bilirubin in Hepatozyten z. T. auch durch Oatp1b2 erfolgt und es bei einem Defekt des Slco1b2-Gens zu einer Anreicherung von konjugiertem Bilirubin im Plasma kommt, wobei dieser Effekt bei den Slco1a/1b *Knockout*-Mäusen deutlich stärker ausgeprägt ist als bei den Oatp1b2(-/-) *Knockout*-Mäusen.

**Ratte Oatp1b2** wurde 2000 von Cattori et al. aus der Leber isoliert (zunächst Oatp4 genannt). Die Sequenzidentität des Proteins zu OATP1B1 und OATP1B3 beträgt 64 % bzw. 66 %. Wie alle OATPs besitzt rOatp1b2 12 Transmembrandomänen mit intrazellulär gelegenen N- und C-Termini (Cattori et al. 2000). Aufnahmestudien an *Xenopus laevis* Oozyten zeigten einen Transport von TC ( $K_m \approx 26,5 \mu M$ ), BSP ( $K_m \approx 1,1 \mu M$ ), E<sub>1</sub>S, E<sub>2</sub>17G und DHEAS. Zu einem geringeren Level konnten auch Prostaglandin E<sub>2</sub>, Leukotrien C<sub>4</sub> und die Schilddrüsenhormone T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> als Substrate identifiziert werden. In einer weiteren Studie 2001 konnte mittels *Western Blot* und Immunfluoreszenz die spezifische Lokalisation des

Ratten Oatp1b2 in der basolateralen Membran der Hepatozyten dargestellt und eine molekulare Masse von 85 kDa bestimmt werden (Cattori et al. 2001).

**Rind Oatp1b4** wurde 2003 von Dr. B. Döring aus der Leber isoliert und kloniert. Mit einem offenen Leserahmen von 2070 Basenpaaren, welche für ein Protein mit 689 Aminosäuren kodieren, wurde die Sequenz mit der Accession No. AJ508747 bei GenBank hinterlegt. Die Sequenzidentität beträgt 69,1 % zu OATP1B3 und 67,9 % zu OATP1B1. Funktionelle Studien an *Xenopus laevis* Oozyten zeigten einen signifikanten Transport von TC, E<sub>1</sub>S, E<sub>2</sub>17G und LTC<sub>4</sub>, nicht jedoch für Ouabain und Digoxin (Döring 2003).

Von weiteren Haussäugetieren waren zu Beginn dieser Arbeit lediglich computergenerierte Sequenzen der Oatp1b-Familie in den Gendatenbanken (NCBI + EMBL) vorzufinden. Diese wurden von genomischen Sequenzen abgeleitet unter Zuhilfenahme von Sequenzalignments zu experimentell verifizierten cDNA-Sequenzen. So wurden die Oatp1b4-Sequenzen von Katze (GenBank Accession No. XM\_006933556), Pferd (GenBank Accession No. XM\_005610968) und Schwein (GenBank Accession No. XM\_003355548) ermittelt.

## 1.5 Der canine Oatp1b4

Die Sequenz des Oatp1b4 des Hundes wurde zunächst nur im Rahmen des *Dog Genome* Projektes prognostiziert (Lindblad-Toh et al. 2005). Die einzigen bisher verfügbaren Daten zum Oatp1b4 des Hundes liegen von Gui und Hagenbuch (2010) vor. Mit Hilfe des *Northern Blots* und Immunoblots konnte nachgewiesen werden, dass sich der cfOatp1b4 genauso wie OATP1B1 und OATP1B3 in der basolateralen Membran der Leber befindet. Die experimentell ermittelte cDNA Sequenz zeigte einen offenen Leserahmen von 2076 Basenpaaren. Das daraus resultierende Protein hat 692 Aminosäuren und ein kalkuliertes Molekulargewicht von ca. 85 kDa. CfOatp1b4 zeigt eine 69 %ige Übereinstimmung mit OATP1B1 und 72 % mit OATP1B3. Wie alle OATP-Transporter weist auch cfOatp1b4 den typischen Aufbau mit 12 Transmembrandomänen und intrazellulär gelegenen N- und C-terminalen Enden auf. Das cfOatp1b4-Gen ist auf Chromosom 27 lokalisiert und besteht aus 16 Exons und 15 Introns, wobei die ersten beiden Exons im 5'-UTR liegen.

An transient transfizierten HEK293 Zellen wurden Transportmessungen mit zahlreichen Substanzen durchgeführt, um das Substratspektrum mit den beiden humanen Transportern zu vergleichen. Dabei zeigte sich, dass TC, E<sub>2</sub>17G, E<sub>1</sub>S, BSP, CCK8 und Docetaxel gemeinsame Substrate von OATP1B1, OATP1B3 und dem caninen Oatp1b4 sind. Für Paclitaxel oder

Digoxin hingegen konnte kein Transport über den Oatp1b4 des Hundes nachgewiesen werden (Gui und Hagenbuch 2010).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die *Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATPs) stellen beim Menschen eine Familie von Transportern mit elf Mitgliedern dar. Sie verteilen sich in Organen, wie Niere, Leber, Gehirn und Darm. Dort sind sie für die Aufnahme von endogenen Substanzen und Arzneistoffen in die Zellen verantwortlich. Der OATP1B1- als auch der OATP1B3-Transporter befindet sich nahezu ausschließlich in der Leber, in der basolateralen Membran der Hepatozyten. Das Substratspektrum dieser Transporter reicht von Statinen, über Antibiotika und Zytostatika bis hin zu ACE-Hemmern. Inzwischen sind bei den humanen OATP1B1- und OATP1B3-Transportern mehrere SNPs bekannt. Für einige ist bereits eine klinische Relevanz beschrieben.

Bei den Haussäugetieren zu denen der Hund, die Katze, das Pferd, das Schwein und das Rind gehören als auch bei Huhn, Maus und Ratte übernimmt ein einziger Transporter die Funktion der beiden humanen OATPs. Auf Grund der Sequenzübereinstimmung zu den humanen Transportern werden sie bei Maus und Ratte *Oatp1b2* und bei den Haussäugetieren *Oatp1b4* genannt. Bisher sind wenige Daten zu diesen Transportern beim Tier bekannt. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, das Wissen über die *Oatp1b*-Transporter beim Tier zu erweitern. Hierfür sollte zum ersten Mal der *Oatp1b4*-Transporter aus der Leber von Pferd, Schwein und Katze isoliert und kloniert werden. Durch funktionelle Studien mit klassischen OATP-Substraten sollte eine erste Charakterisierung und ein Vergleich zu den humanen OATP1B1 und OATP1B3 erfolgen.

Ein besonderes Augenmerk sollte auf die systematische Untersuchung eines Patientenkollektivs von Hunden verschiedener Rassen, Alters und Geschlechts auf Polymorphismen im *cfOatp1b4*-Transporter gelegt werden. Hierfür wurde die cDNA aus Leberproben untersucht und jede Sequenz auf das Auftreten von Polymorphismen hin untersucht. Anschließend sollte eine Bewertung der gefundenen Polymorphismen auf funktioneller Ebene erfolgen. In der täglichen Praxis stößt man immer wieder auf eine individuell unterschiedliche Verträglichkeit von Arzneimitteln, die sich zum Teil auch in behandlungsrelevanten unerwünschten Arzneimittelwirkungen äußern. Die Leber ist als Hauptstoffwechselorgan bei der Entgiftung/Verstoffwechslung nahezu aller Arzneimittel beteiligt. Somit kann angenommen werden, dass genetische Unterschiede bei z.B. Membrantransportern, welche am Transport von Substanzen in die Leberzellen beteiligt

sind, Auswirkungen auf die Stoffwechselrate und somit auch die Plasmakonzentrationen von Arzneimitteln haben.

Diese Arbeit sollte helfen wichtige Erkenntnisse über die Funktion des Oatp1b4-Transporters beim Hund zu erlangen, sowie mögliche Auswirkungen von Polymorphismen auf die Transportleistung des Oatp1b4 zu untersuchen. Hierdurch sollte die Grundlage für individuell angepasste Therapiemöglichkeiten geschaffen werden, abhängig von der genetischen Ausstattung eines Tieres, um eine Reduktion von unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu erzielen.

## 2 MATERIAL

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle verwendeten Ansätze, Puffer und Medien mit bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) auf das entsprechende Volumen aufgefüllt. Die Nichtbenutzung von <sup>TM</sup> oder ® bedeutet nicht, dass die Produktbezeichnungen frei verfügbar sind.

### 2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

#### 2.1.1 Eingesetzte Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')	T <sub>m</sub> (°C)
<b><u>Zur Generierung der full length-Amplifikate</u></b>		
cf-Oatp1b4-F	ttc tat gat ctc tcg agc ag	58
cf-Oatp1b4-R	ggg aac tgt taa tga agg ac	58
cf-Oatp1b4-F1	gcc tgc act gct ttt cta tg	60
cf-Oatp1b4-R1	cat aac ggt ggg gga act g	60
r-Oatp1b2-F	gtt aga cat gcc acg ctt g	58
r-Oatp1b2-R	cct ttc ccc ttt gtc cat c	58
sus-Oatp1b3-F	aag aca aca gag gca caa tc	58
sus-Oatp1b3-R	tct cta ttc cct ttt cac ttc	58
sus-Oatp1b3-F1	atg gcc cag aat caa cat ttg	60
sus-Oatp1b3-R1	ttc cct ttt cac ttc tac ctg	60
equ-Oatp1b3-F	att cac atg ata tct gta gtt c	58
equ-Oatp1b3-R	atg tgt ttc acc atc tgc tc	58
equ-Oatp1b3-R1	cca tca taa gta aag agt gtg	58
m-Oatp1b2-F	aga ctg ctg gtg ctt tgt g	58
m-Oatp1b2-R	ctt tcc cgc ttt gtc cat c	58
m-Oatp1b2-F1	aag gca tag ggt agg cgg tc	64
m-Oatp1b2-R1	cag tct tta caa ccc ata cag c	64
gg-Oatp1b3-F	cag att ttg agt att cgt gtg	58
gg-Oatp1b3-R	ttc tat tcc ttt gcc ttt ctg	58
<b><u>Sequenzierung der PCR-Produkte</u></b>		
cf-Oatp1b4-Fseq	gat ttt gct gaa gaa gga c	54
cf-Oatp1b4-Fseq1	ctc aat aga aca tca cct g	54
cf-Oatp1b4-Rseq	cta tct ctt ggg cat tca c	56
cf-Oatp1b4-Rseq1	tcc att ttc tga tgc ctt g	54
cf-Oatp1b4-Rseq2	aca agg aaa cca agc cac	54

r-Oatp1b2-Fseq	cta ggt act ctg cat act a	54
sus-Oatp1b3-Rseq	aga gat ttc att tca ggt tg	54
sus-Oatp1b3-Rseq1	ttg tag gcg att cat tat tc	54
sus-Oatp1b3-Fseq	cct tgg gga ttt ctt acc	54
bt-Oatp1b4-Fseq	gat ttt gct gaa gaa gga c	54
equ-Oatp1b4-Fseq	ctt ggg gat ttc tta ctt g	54

### **Zielgerichtete Mutagenese**

r-Oatp1b2-mut-R	aag agg tgt ttc att gct ttg ttc	61
sus-Oatp1b4-mut-R	aat atg tgt ttc ccg gtc cac	63
equ-Oatp1b4-mut-R	gaa atg tgt ttc acc atc tgc tc	62
fc-Oatp1b4-mut-R	cat atg tgc ttc att gtc tga aga ag	62
cf-Oatp1b4-mut-R	cat atg tgt ctc att gtc ttc tct g	61

## **2.1.2 Enzyme**

### **2.1.2.1 Hitzebeständige DNA-Polymerasen**

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase  
(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

- Pyrokoccus-ähnliches Enzym, lacl-basierte Methode
- 3' → 5' Exonuklease Aktivität (proofreading)

Fast Start High Fidelity PCR System  
(Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim)

- Mix aus Taq DNA Polymerase und einem thermostabilen Protein (proofreading)

Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix  
(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

- Pyrokoccus-ähnliches Enzym mit spezieller Domäne für schnelles und exaktes Arbeiten
- 3' → 5' Exonuklease Aktivität (proofreading)
- Ready-to-use Mastermix ermöglicht Benutzung von PCR-Protokollen mit sehr kurzen Zykluszeiten

### 2.1.2.2 Reverse Transkriptase

#### SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, bezogen über Life Technologies, Darmstadt)

- Version der reversen Transkriptase des M-MLV (Murine Moloney Leukemia Virus) mit erhöhter Thermostabilität und reduzierter RNase H-Aktivität

### 2.1.2.3 Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	BSA	Hersteller
<i>Kpn</i> I	5'...GGTAC↓C...3' 3'...C↑CATGG...5'	Puffer <i>Kpn</i> I	+	Thermo Scientific

### 2.1.2.4 Sonstige Enzyme

#### DNase I

(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

- RNase-frei

#### DyNAzyme II DNA Polymerase

(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

- Rekombinantes *Taq*-ähnliches Enzym mit verbesserter Hitzestabilität

### 2.1.2.5 Sonstiges Material

#### dNTPs

(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

- Je 10 mM

#### Wasser für die Molekularbiologie

(Roth, Karlsruhe)

- Durch Zusatz von DEPC Modifikation der Histidinreste an Proteinen zu N-Carbethoxyhistidin -> Hemmung von RNasen und DNasen



## 2.2 Vektoren

### 2.2.1 pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO Vektor

(Life Technologies, Darmstadt)

- Geamtlänge: 5094 bp
- CMV Promoter, T7 Promoter, *bla* Promoter, TOPO Klonierungsstelle, V5 Epitop, Polyhistidin (6xHis) Region, FRT site , BGH PolyA, SV40 early PolyA, Hygromycin & Ampicillin resistance gene, pUC origin

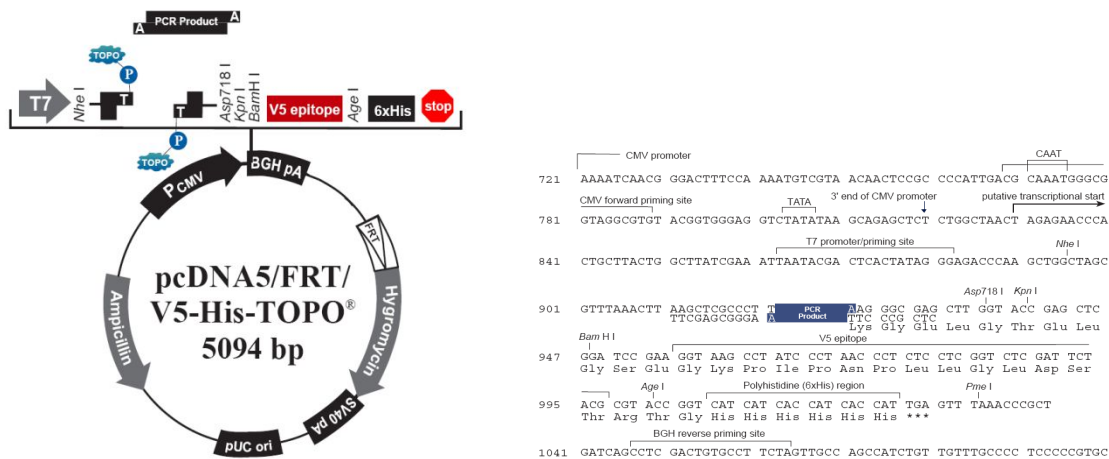


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* Vektors

### 2.2.2 pOG44 Vektor

(Life Technologies, Darmstadt)

- Gesamtlänge: 5785 bp
- CMV-Promoter, synthetisches Intron, Leserahmen Flp Recombinase (FLP), SV40 PolyA, pUC origin, *bla* Promoter, Ampicillin resistance gene

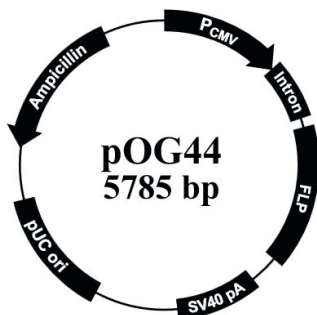


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des *pOG44* Vektors

## 2.3 Bakterienstämme

One Shot TOP10 chemically competent  
*E. coli*  
(Life Technologies, Darmstadt)

- Genotyp: F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  
 $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139*  
 $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>)  
*endA1 nupG*

## 2.4 Quantitative *Real-Time PCR*

Alle aufgelisteten *TaqMan Gene Expression Assays* wurden von Life Technologies bezogen. Sie wurden aus kommerziell erhältlichen, bereits vorgefertigten *Assays* ausgewählt. Das Präfix Hs steht für *Homo sapiens* und Cf für *Canis familiaris*. Die Endung \_m bedeutet, dass die Sonde auf der Exongrenze zweier benachbarter Exone liegt und somit keine genomische DNA detektiert werden kann. Die Endung \_g hingegen bedeutet, dass Primer und Sonde innerhalb eines Exons liegen, wodurch auch genomische DNA erkannt wird. Ein DNase-Verdau vor Verwendung in der *Real-Time PCR* ist somit notwendig.

### 2.4.1 TaqMan Gene Expression Assays

ACTB canis	Cf03023880_g1
B2M canis	Cf02659073_m1
SLCO1B3 canis	Cf02624370_m1
GAPDH human	Hs99999905_m1
ACTB human	Hs01060665_g1

Komponenten:      Zwei unmarkierte Primer zur Amplifikation  
                         FAM-markierte TaqMan MGB (*minor groove binder*) Sonde

### 2.4.2 TaqMan Universal PCR

Komponenten:      AmpliTaq Gold DNA Polymerase  
                         dNTPs mit dUTP  
                         Referenzfarbstoff ROX  
                         Optimierte Pufferkomponenten

## 2.5 Längenstandards

### Agarose-Gelelektrophorese

<u>Gene Ruler DNA Ladder Mix (bp)</u>	100, 200, 300, 400, <b>500</b> , 600, 800, 900,
(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)	<b>1000</b> , 1200, 1500, 2000, 2500, <b>3000</b> , 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000

## 2.6 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien für die Molekularbiologie

HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	SLG, Gauting
High Pure PCR Produkt Purification Kit	Roche, Mannheim
First Strand cDNA Synthesis Kit	Life Technologies, Darmstadt
QIA Prep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Agilent DNA7500 Kit	Agilent Technologies, Böblingen
Agilent RNA6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Böblingen
Q5 Site-Directed Mutagenese Kit	NEB, Frankfurt a.M.
RNA later Tissue Collection: RNA Stabilization Solution	Applied Biosystems, Darmstadt
RNaseZAP Wipes	Life Technologies, Darmstadt
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TriReagent	Sigma, Taufkirchen
Super Script III First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.7 Puffer und Medien

<b>LB-medium (1 l)</b>	Trypton	10 g
	NaCl	10 g
	Yeast-Extract	5 g
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren</li> <li>• vor Gebrauch Selektionsmedium hinzufügen</li> </ul>	
<b>LB-Agar (1 l)</b>	LB-Medium	1 l
	Agar-Agar	20 g
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Autoklavieren und auf 60° C abkühlen lassen</li> <li>• Selektionsantibiotikum zufügen und Platten gießen</li> </ul>	

<b>SOC Medium</b>	Trypton	2 %
	Yeast-Extract	0,50 %
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	Glucose	20 mM

## 2.8 Native Gelelektrophorese

<b>6 x Ladepuffer (MBI-Fermentas, St. Leon-Roth)</b>	Tris-HCl		10 mM
	Bromphenolblau		0,03 %
	Xylen Cyanol FF		0,03 %
	Glycerin		60 %
	EDTA		60 mM
<b>10 x TAE-Puffer (1 l)</b>	Tris	400 mM	48,4 g
	Essigsäure		11,4 ml
	0,25 M EDTA (pH 8,0)	10 mM	40 ml
<b>1 % Agarosegel</b>	Agarose		1 g
	1x TAE-Puffer		100 ml
<b>GelRED-Färbelösung</b>	GelRED		300 µl
	1 M NaCl		100 ml
	ddH <sub>2</sub> O		900 ml

## 2.9 Zellkultur

### 2.9.1 Zelllinien

#### 2.9.1.1 FlpIn T-Rex 293 Zellen

(Life Technologies, Darmstadt)

(im Folgenden wird diese Zelllinie als FlpIn-HEK293 Zellen bezeichnet)

Wirtszelllinie:	<i>human embryonic kidney cells 293</i> (HEK293) ATCC-Nummer CRL-1573
Modifikation:	stabile Integration einer <i>FRT</i> site in das Genom (pFRT/ <i>lacZeo</i> ) konstitutive Expression eines Tet-Repressors (pcDNA6/TR)
Charakteristika:	adhärent wachsend Zeozinresistent → Selektion auf integrierte <i>FRT site</i> Blasticidinresistent → Selektion auf pcDNA6/TR (Tet-Repressor)

### 2.9.1.2 GripTite 293 MSR Zellen

(Life Technologies, Darmstadt)

(im Folgenden wird diese Zelllinie als MSR-293 Zellen bezeichnet)

Wirtszelllinie: *human embryonic kidney cells 293* (HEK293-H)  
 Modifikation: konstitutive Expression des *human macrophage scavenger receptor type 1* (MSR1) (pCMV SPORT6 MSR.neo)  
 Charakteristika: adhärent wachsend, Geneticin resistent

### 2.9.1.3 MDCK Zellen

Wirtszelllinie: *Madin Darby canine kidney cells*  
 Charakteristika: adhärent wachsend  
 Epithelzellcharakter

### 2.9.1.4 HepG2 Zellen

Wirtszelllinie: *Human Caucasian hepatocyte carcinoma cells*  
 ATCC-Nummer HB-8065  
 Charakteristika: adhärent wachsend  
 Absonderung von Albumin, Transferrin, Fibrinogen, Transferrin, Plasminogen,  $\alpha$ -2-Makroglobulin,  $\alpha$ -1-Antitrypsin

## 2.9.2 Medien

<b>HEK293-Medium (500 ml)</b>	D-MEM (high glucose)		217,5 ml
	F-12 (HAM)		217,5 ml
	FKS	10 %	50 ml
	L-Glutamin (200 mM)	4 mM	10 ml
	Pen/Strep (1000 Units/ml; 1000 $\mu$ g/ml)	1 %	5 ml
<b>GripTite MSR-Medium (500 ml)</b>	D-MEM (high glucose)		430 ml
	FKS	10 %	50 ml
	MEM Non Essential Amino Acids (NEAA)	0,1 mM	5 ml
	L-Glutamin	4 mM	10 ml
	Pen/Strep (1000 Units/ml; 1000 $\mu$ g/ml)	1 %	5 ml
<b>Trypsinlösung (100 ml)</b>	Trypsin	0,025 %	25 mg
	HEPES-Puffer		100 ml

<b>HEPES-Puffer (1 l)</b>	HEPES	18 mM	4,77 g
	NaCl	120 mM	7,07 g
	KCl	5 mM	0,4 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 mM	0,06 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,3 mM	0,08 g
	Glukose	6 mM	1 g
	Phenolrot	0,03 mM	0,01 g
	EDTA	1 mM	0,37 g
	• pH 7,3 mit HCl/NaOH einstellen, autoklavieren		
<b>Einfriermedium</b>	Standardmedium der entsprechenden Zelllinie	90 %	
	DMSO	10 %	
<b>Beschichtungsmedium</b>	Poly-L-Lysin	100 µg/ml	5 mg
	PBS		50 ml
<b>Trypanblau (100 ml)</b>	Trypanblau	4 %	4 g
	NaCl	0,9 %	0,9 g

### 2.9.3 Antibiotika

Antibiotika	Verwendungszweck	Endkonzentration	Hersteller
Hygromycin B (50mg/ml)	Selektion auf Insert	150 µg/ml	Roth, Karlsruhe

### 2.9.4 Stabile und transiente Transfektion

#### 2.9.4.1 Transfektionsreagenzien

FuGENE HD Transfection Reagent	Promega, Madison, WI, USA
Lipofectamin 2000	Life Technologies, Darmstadt

#### 2.9.4.2 Medien zur Transfektion

<b>HEK293-Medium ohne Antibiotika (50 ml)</b>	D-MEM (high glucose)		22 ml
	F-12 (HAM)		22 ml
	FKS	10 %	5 ml
	L-Glutamin (200 mM)	4 mM	1 ml

## MATERIAL

<b>GripTite MSR-Medium</b>	D-MEM (high glucose)		43,5 ml
<b>ohne Antibiotika</b>	FKS	10 %	5 ml
<b>(50 ml)</b>	MEM Non Essential Amino Acids (NEAA)	0,1 mM	0,5 ml
	L-Glutamin	4 mM	1 ml

**Opti-MEM**  
(Life Technologies,  
Darmstadt)

**Natriumbutyrat** 2-4 mM

## 2.10 Transportmessungen an eukaryotischen Zellen

### 2.10.1 Puffer und Lösungen

<b>Transportpuffer mit Na<sup>2+</sup></b> <b>(1 l)</b>	NaCl	142,9 mM	8,35 g
	KCl	4,7 mM	0,35 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,2 mM	0,296 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	0,163 g
	HEPES	20 mM	4,777 g
	200 mM CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM	9 ml
	(0,294 g / 10 ml ddH <sub>2</sub> O)		
	• pH 7,4 mit 1 M KOH einstellen, kühl lagern		
<b>Lysepuffer (1 l)</b>	NaOH	1 N	40,01 g
	SDS	0,1 %	1 g
<b>Szintillationsflüssigkeit</b>	Isopropanol		300 ml
	Aqua bidest		300 ml
	Rotiszint eco plus		6000 ml

## 2.11 Proteinbestimmung

Nach Lowry

<b>Stammlösung für Protein-</b> <b>standardreihe</b>	BSA (bovines Serum Albumin, Cohn Fraktion V)	2 mg
	Lysepuffer	1 ml
<b>Lösung C (für 100 Wells)</b>	4 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 ml
	1 % CuSO <sub>4</sub>	0,8 ml
	2 % K <sup>+</sup> -Na <sup>+</sup> -Tartrat	0,8 ml

## MATERIAL

<b>Folin-Lösung (für 100 Wells)</b>	Folin & Ciocalteu's phenol reagent	1 ml
	ddH <sub>2</sub> O	3 ml

### BCA-Assay (Novagen, Merck KGaA Darmstadt)

<b>Stammlösung für Protein-standardreihe</b>	BSA (bovines Serum Albumin, Cohn Fraktion V)	2 mg
	Lysepuffer	1 ml

<b>BCA Solution (100 Wells)</b>	200 µl/Well	20 ml
---------------------------------	-------------	-------

<b>4 % CuSO<sub>4</sub> freie Lösung (100 Wells)</b>	4 µl/Well	400 µl
--	-----------	--------

## 2.12 *Xenopus laevis* Oozyten

### 2.12.1 Versuchstiere

Die verwendeten Oozyten wurden von weiblichen *X. laevis* Fröschen, die zu der Art der Krallenfrösche gehören, entnommen. Die Tiere sind Wildfänge und werden von Xenopus Express (Frankreich) bezogen und im Tierstall der Tierphysiologie im Karl-Vogt Haus (MZVG) gehalten. Die durchzuführenden Tierversuche wurden unter der Tierversuchsanzeige mit der Kennzeichnung JLU\_400 beantragt und genehmigt.

### 2.12.2 Puffer und Lösungen

<b>OR-2 Ca<sup>2+</sup>-freie Lösung (1 l)</b>	NaCl	82,5 mM	4,82 g
	HEPES	5 mM	1,19 g
	KCl	2,5 mM	0,186 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,0 mM	0,2033 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,0 mM	0,178 g
	• pH 7,8 mit KOH einstellen, autoklavieren		

<b>Modifizierte Barth's Lösung (1 l)</b>	NaCl	88 mM	5,14 g
	HEPES	15 mM	3,57 g
	NaHCO <sub>2</sub>	2,4 mM	0,2 g
	KCl	1,0 mM	0,0745 g
	Ca(NO <sub>3</sub> ) x 2 H <sub>2</sub> O	0,41 mM	0,0603 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,82 mM	0,2 g
	• pH 7,6 mit NaOH einstellen, autoklavieren		
	• vor Gebrauch 0,1 % Gentamicin zufügen		



## MATERIAL

<b>Natrium-Lösung (1 l)</b>	NaCl	100 mM	5,84 g
	HEPES	10 mM	2,385 g
	KCl	2 mM	0,149 g
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1 mM	0,147 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 mM	0,2033 g
	<ul style="list-style-type: none"> <li>pH 7,5 mit 1 mM Tris einstellen, kühl lagern</li> </ul>		
<b>Kollagenase-Lösung (10 ml)</b>	Kollagenase D		4 mg
	OR-2 Ca <sup>2+</sup> -freie Lösung		10 ml
<b>Lysepuffer</b>	SDS	10 %	100 g
	dd H <sub>2</sub> O		1 l
 <b>2.13 Immunfluoreszenz</b>			
<b>2.13.1 Puffer und Medien</b>			
<b>10 x PBS (1 l)</b>	NaCl	1380 mM	80 g
	KCl	27 mM	2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	100 mM	26,8 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18 mM	2,4 g
	<ul style="list-style-type: none"> <li>pH 7,4 mit HCl einstellen, kühl lagern</li> <li>vor Verwendung autoklavieren</li> </ul>		
<b>2 % PFA (50 ml) phosphatgepuffert</b>	PFA	2 %	1 g
	ddH <sub>2</sub> O (50-60 °C)		45 ml
	10 x PBS		5 ml
	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 bis 2 Tropfen NaOH dazugeben</li> <li>unter Rühren bei 50° C lösen</li> <li>pH 6,8 - 7,2 mit HCl einstellen</li> </ul>		
<b>Puffer A (110 ml)</b>	Glycin	20 mM	165,22 mg
	1 x PBS		110 ml
<b>Puffer B (70 ml)</b>	BSA	1 %	700 mg
	Puffer A		70 ml
<b>Blockierlösung (70 ml)</b>	Serum (Ziege)	4 %	2,8 ml
	Puffer B		67,2 ml

## MATERIAL

<b>DAPI/Methanol (1:5.000)</b>	DAPI (1 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O)	50 µl
	Methanol	250 ml

<b>Eindeckelmedium</b>	ProLong Gold Antifade Reagent (Life Technologies, Darmstadt)
------------------------	---

## 2.14 Proteinanalyse

### 2.14.1 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

	<b>Sammelgel, 4 % (15 ml)</b>	<b>Trenngel, 8 % (45 ml)</b>
ddH <sub>2</sub> O	9 ml	20,05 ml
0,5 M Tris HCl (pH 6,8)	3,75 ml	---
1,5 M Tris HCl (pH 8,8)	---	12,5 ml
10 % SDS	0,15 ml	0,5 ml
30 % Acrylamid	1,95 ml	12,5 ml
10 % APS	75 µl	250 µl
TEMED	15 µl	25 µl

<b>10 x Tris-Glycin-SDS-Elektrophoresepuffer (1 L)</b>	Tris	250 mM	30,3 g
	Glycin	1920 mM	144 g
	SDS	1 %	10 g
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH 8,3 mit HCl einstellen</li> <li>• als 1 x verwenden</li> </ul>		

<b>4 x Lämmli Puffer (10 ml)</b>	SDS	8 %	0,8 g
	Glycerin	40 %	4 g
	β-Mercaptoethanol	20 %	2 ml
	Bromphenolblau	0,01 %	0,8 mg
	1 M Tris (pH 6,8)	0,25 M	2,5 ml
	ddH <sub>2</sub> O		ad 10 ml

### 2.14.2 Puffer und Lösungen für *Western Blot*

<b>Kathodenpuffer (500 ml)</b>	6-Amminohexansäure	40 mM	2,62 g
	Tris	25 mM	1,51 g
	Methanol	20 %	100 ml
	ddH <sub>2</sub> O		ad 500 ml

## MATERIAL

<b>Anodenpuffer (500 ml)</b>	Tris	30 mM	1,82 g
	Methanol	20 %	100 ml
	ddH <sub>2</sub> O		ad 500 ml
<b>Konz. Anodenpuffer (500 ml)</b>	Tris	300 mM	18,2 g
	Methanol	20 %	100 ml
	ddH <sub>2</sub> O		ad 500 ml
<b>10 x TBS (1 l)</b>	NaCl	1370 mM	12,1 g
	Tris	100 mM	121,2 g
	• pH 8,0 mit HCl einstellen		
<b>1 x TBS-T (1 l)</b>	1 x TBS		1 l
	Tween 20	0,05 %	121,2 g
<b>Blockierlösung 5 % (50 ml)</b>	1 x TBS-T		50 ml
	Milchpulver	5 %	2,5 g
<b>Blockierlösung 10 % (50 ml)</b>	1 x TBS-T		50 ml
	Milchpulver	10 %	5 g
<b>Stripping Puffer (800 ml)</b>	SDS		16 g
	Tris-HCl		6,06 g
	• pH 6,7 einstellen		

### 2.14.3 Filmentwicklung

Amersham Hyperfilm ECL	GE Gealthcare, Buckinghamshire, UK
Hypam Schnellfixierer (1:25 in H <sub>2</sub> O)	Ilford, Cheshire, England, UK
Rodinal B & W Film Developer (1:5 in H <sub>2</sub> O)	Agfa, Leverkusen

### 2.14.4 Längenstandards

#### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

<u>Roti Mark Western Marker</u> (Roth, Karlsruhe)	10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 120 kDa
<u>Precision Plus Protein Standards</u> (Bio-Rad, München)	10, 15, 20, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 250 kDa
<u>Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder</u> (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)	10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250 kDa
<u>Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder</u> (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)	10, 15, 25, 35, 40, 50, 70, 100, 140, 260 kDa

### 2.14.5 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien für die Proteinanalyse

BCA Protein Assay Kit	Novagen (Merck KGaA), Darmstadt
ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit	Merck Millipore, Darmstadt
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Life Technologies, Darmstadt
Rotilumin 1 & 2	Roth, Karlsruhe

### 2.15 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Primärantikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
Anti-V5	GKPIPNNLLGLDST	Monoklonal, Maus	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-GAPDH	C-HQVVSSDFNSDT	Polyklonal, Ziege	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sekundärantikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
Anti-Maus-IgG-Alexa Fluor 488	Maus IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
HRP Western Blot Anti-Mouse IgG Antibody	Maus IgG (H+L)	Polyklonal, Ziege	Rockland, Gilbertsville
ZyMax Kaninchen Anti-Ziege IgG HRP Konjugat	Ziege IgG (H+L)	Polyklonal, Kaninchen	Invitrogen, Darmstadt
Fluoreszenzfarbstoff			
DAPI	Färbung von Zellkernen		Roche Diagnostics, Mannheim

## 2.16 Chemische Substanzen

### 2.16.1 Reagenzien

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Agarose Ultra pur	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovines Serum Albumin, BSA	Roche, Mannheim
Calciumchlorid Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Calciumnitrat Tetrahydrat, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DAPI, 4',6'-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid	Roche, Mannheim
DEPC, Diethylpyrocarbonat	Roth, Karlsruhe
D-Glukose	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
DMEM, Dulbecco's modified eagle's serum	Life Technologies, Darmstadt; PAA, Pasching; Gibco, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure- $\text{Na}_2$	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (> 99,9 %), EtOH abs.	Roth, Karlsruhe
F-12 Nutrient Mixture (HAM) + Glutamin	Life Technologies, Darmstadt; PAA, Pasching; Gibco, Karlsruhe
FKS, fetales Kälberserum	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Folin & Ciocalteu's phenol Reagenz	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
GelRed	Biotium, Hayward, CA, USA
Gentamicin	Sigma Aldrich, Taufkirchen; Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hygromycin B	Roth, Karlsruhe
Immersion liquid Typ N (Öl für Mikroskopie)	Leica, Wetzlar
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid, KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid, KOH	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ D	Roche Diagnostics, Mannheim
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Lämmli Puffer (2-fach Konzentrat)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
LB-Medium (Luria/Miller)	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe, PAA, Pasching
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
MEM Non Essential Amino acids (NEAA)	PAA, Pasching
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver, Blotting grade, fettarm	Roth, Karlsruhe
Mineralöl für Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe
Molekularbiologisches Wasser	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat, $\text{NaCO}_3$	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, $\text{NaHCO}_3$	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, NaOH	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd, PFA	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe, PAA, Pasching
Phenolrot	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Poly-D-Lysin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S Solution	Sigma Aldrich, Taufkirchen
ProLong Antifade	Invitrogen, Karlsruhe
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol-Chloroform Lösung	Roth, Karlsruhe
Rotiszint 22 eco Szintillatoröl	Roth, Karlsruhe
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure, HCl	Roth, Karlsruhe
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Flüssiger Stickstoff, $\text{N}_2$	Messer, Griesheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Serva, Heidelberg
TriReagent	Sigma, Taufkirchen
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Fluka, Seelze
Trypsin	PAA, Pasching, Österreich
Trypton	Roth, Karlsruhe

Tween 20, Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat	Roth, Karlsruhe
Xylen Cyanol FF	Sigma Aldrich, Steinheim
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

## 2.16.2 Feinchemikalien

Bromosulfophthalein, BSP	Sigma, Steinheim
Cholecystokinin 8, CCK8	PerkinElmer, Boston, MA, USA
Digoxin	Sigma, Steinheim
Enalapril	Sigma, Steinheim
Estron-3-sulfat, E <sub>1</sub> S	Sigma, Steinheim
Taurocholat, TC	Sigma, Steinheim

## 2.17 Radioaktiv-markierte Substanzen

Substanz	Spezifische Aktivität (Ci/mmol)	Konzentration ( $\mu$ M)	mCi/ml	fmol/dpm
[ <sup>3</sup> H]BSP <sup>a</sup>	10,2	98	1	0,04456
[ <sup>3</sup> H]CCK8 <sup>b</sup>	80	2,5	0,2	0,00568
[ <sup>3</sup> H]Digoxin <sup>b</sup>	17	58,82	1	0,02674
[ <sup>3</sup> H]E <sub>1</sub> S <sup>b</sup>	45,6	21,93	1	0,00997
[ <sup>3</sup> H]TC <sup>c</sup>	30	50	1,5	0,01515

Bezogen von: a) Hartmann Analytic, Braunschweig b) ARC, St. Louis, MO, USA c) Alan F. Hofmann, University of California, San Diego, USA

## 2.18 Geräte

7300 Real Time PCR System	Life Technologies, Darmstadt
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Analysewaagen:	
AE240	Mettler-Toledo, Gießen
Cubis Ultramikrowaage	Sartorius, Göttingen
Precisa 3000C-6000D	DAK-Oerlikon, Zürich
XSE204	Mettler-Toledo, Gießen
Autoklav Sanoclav	Wolf, Geislingen
Autoklav Systec 3150 EL	Systec, Wettenberg
BioPhotometer Spectrophotometer UV/VIS	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Bürker Zählkammer	Roth, Karlsruhe
CO <sub>2</sub> -Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA
Divac 2.4L Vakuumpumpe	Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Elektrophoresis Power Supply EPS600	Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Elektrophorese-Kammern	Werkstatt MZI, Gießen
14,5 x 6,5 cm	
35,5 x 11,0 cm	
FastPrep-24 Instrument	MP Biomedicals, Eschwege
Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1490	Pharmacia, Freiburg
Fluoreszenz-Mikroskop DM5500B TL (BF+PH)	Leica, Wetzlar
Software LAS AF 6000 mit 3D Deconvolution	
S/W Kamera DFC340FX	
Filter A4 UV (Ex: BP 360/40x, BS: 400, Em: BP 470/40)	
Filter L5 (Ex: EP 480/40, BS: 505, EM: BP 527/30)	
Filter Y3 (Ex: BP 545/30, BS: 565, Em: 610/75)	
Filter N2.1 (Ex: BP 515-560, BS: 580, Em: LP 590)	
Objektiv N PLAN 5x/0.12 -/A 14.0	
Objektiv HCX PL FL 10x/0.30 PH1 -/D 11.0	
Objektiv HC PLAN APO 20x/0.70 0.17/C 0.59	
Objektiv HCX PL APO 40x/0.85 CORR, 0.11-0.23	
Okular HC PLAN s 10x/25 Br. M	
G24 Environmental Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA



Gelschlitten	Werkstatt MZI, Gießen
12 x 18 cm	
7,5 x 5 cm	
Hybridisierungssofen HB-1000 Hybridizer	UVP, Upland, CA, USA
HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Image Master VDS	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Laminar Flow, Clean Air, Typ DLF-REL6	Heraeus, Hanau
Laminar Flow, DanLAF VFR 1806	Claus Damm, Fredensborg, DK
Laminar Flow, NU-437-500-E	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Mikroinjektor Nanoliter 2000	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Mikromanipulator	Bachofer, Reutlingen
Mikroskop Fluovert	Leica, Wetzlar
Mikroskop M3Z	Wild, Heerbrugg
Mikroskop ICC50 HD	Leica, Wetzlar
PerfectBlue 'Semi-Dry'-Blotter Sedec M, 20 x 20 cm	PeqLab, Erlangen
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin L, 20 x 20 cm	PeqLab, Erlangen
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Pipetten 0,5 -10 µL; 2-20 µL; 10-100 µL; 20-200 µL; 100-1000µl	Biohit über Sartorius, Rosbach
Pipetten 20, 50, 100 µL; Mehrkanalpipette 40 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 2, 10, 20, 200, 1000, 5000 µL; Mehrkanalpipette 200 µL	Gilson, Middleton, WI, USA
Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)	Werkstatt MZI, Gießen
Taumler Heidolph Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermocycler:	
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
Primus 96 advanced gradient	PeqLab, Erlangen
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vortex VF 2	Janke und Kunkel, Staufen
Wärmeplatte	Werkstatt MZI, Gießen
Wäremschrank	Melag, Berlin
Wasserbäder:	
WB 7	Memmert, Schwalbach
SW 21	Julabo, Seelbach
GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
TFB 45	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge 5471R	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau

Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Vakuumzentrifuge Speed Vac SC 110	Salvant, Farmingdale, NY, USA
Centrifuge/Vortex Combispin FLV-2400	PeqLab, Erlangen

## 2.19 Verbrauchsmaterial

12,5 cm <sup>2</sup> Kulturschalen	BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
25 cm <sup>2</sup> Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
75 cm <sup>2</sup> Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
6-Well Platten	Greiner bio one, Frickenhausen
12-Well Platten	Greiner bio one, Frickenhausen
24-Well Platten	Greiner bio one, Frickenhausen
48-Well Platten	Greiner bio one, Frickenhausen
96-Well ELISA-Platten	Life Technologies, Darmstadt
Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, 0,45 µm	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
CryoPure Gefäß, 2,0 ml mit Innengewinde & Silikonring	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen, Ø 12 mm	Roth, Karlsruhe
Einmalhandschuhe, Latex	Roth, Karlsruhe
Einmalkanülen Sterican	Braun, Melsungen
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen, 1 ml	Braun, Melsungen
Einwegskalpell	Megro, Wesel
Gel Blotting Paper	Schleicher und Schuell, Dassel
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, Glas	MAGV, Rabenau
PCR-Tubes, 0,2 ml	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Petrischalen	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Nerbe plus, Winsen/Luhe
PonyVial H/I (Minivial)	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 5 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
RNaseZAP Wipes	Life Technologies, Darmstadt
Rotilabo-Blottingpapiere, Dicke 35 mm, 20 x 20 cm	Roth, Karlsruhe
Schraubdeckelgefäße (8 ml, 15 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Special autoclavable bags	Nerbe plus, Winsen/Luhe

Sterilfilter Filtropur S 0,2  
UVetten  
Zellschaber, 25 cm Länge

Sarstedt, Nümbrecht  
Eppendorf, Hamburg  
Sarstedt, Nümbrecht

## 2.20 Bioinformatische Programme und Datenbanken

BLAST, NCBI

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Vergleich von Sequenzen gegen die Datenbank

ClustalW

- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- Sequenzalignments

DNASTar Version 8.0.2, Lasergene, Madison, USA

- EditSeq -> Bearbeiten von Sequenzen
- MegAlign -> Vergleichen und Alignen von Sequenzen

EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute

- <http://www.ebi.ac.uk/>
- Datenbankportal Europa

Ensembl, EBI

- <http://www.ensembl.org/index.html>
- Gen Browser

FinchTV (Geospiza)

- <http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>
- Auswertung von Sequenzspuren

GraphPad Prism 6, San Diego, CA, USA

- Berechnung und Darstellung von Kinetiken, Graphiken, statistische Auswertung

NCBI

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Datenbankportal des National Center for Biotechnology Information, USA
- Literaturrecherche, Sequenzsuche

Oligo 4.0

- Primerauswahl

TreeView 1.6.6

- <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- Darstellung von Verwandtschaftsdiagrammen

## 3 METHODEN

### 3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Im Folgenden werden grundlegende molekularbiologische Methoden erläutert, welche in dieser Arbeit Anwendung fanden.

#### 3.1.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde eine native Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurde zunächst ein in der Regel 1 %-iges Agarosegel hergestellt, indem in 100 ml 1 x TAE Puffer 1 g Agarose unter Aufkochen gelöst wurde. Nach kurzem Abkühlen wurde das Gel gegossen und nach Erhärten in eine mit 1 x TAE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die mit 6 x Ladepuffer vermischten Proben wurden im Anschluss in die Taschen des Gels pipettiert. Die Größenbestimmung erfolgte mit Hilfe eines parallel aufgetragenen Längenstandards (*GeneRuler DNA Ladder Mix*, MBI Fermentas). Durch Anlegen einer Spannung von 5-10 V/cm wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt und der Lauf abgebrochen, sobald die Bromphenolblaufront ca. 2/3 des Gels erreicht hat. Zum Anfärben der DNA wurde das Gel 30-40 min in eine *GelRed* Lösung gelegt und anschließend auf einem UV-Transilluminator fotografiert.

#### 3.1.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Nach der Auftrennung der DNA in einem Agarosegel (siehe Kapitel 3.1.1) erfolgte ein kurzer, 10-minütiger Färbeschritt in einem *GelRed* Bad. Anschließend wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht Kontrolle ausgeschnitten und die Gelstücke in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Das Herauslösen und Aufreinigen der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mittels dem *Hi Yield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit* (SLG). Zu dem ausgeschnittenen Gelstück wurden 500 µl *DF Puffer* gegeben und der Ansatz für 10-15 min bei 58 °C inkubiert. Währenddessen wurde zum besseren Lösen des Agarosegels der Ansatz alle 2-3 min geschwenkt. Bevor die Probe auf eine *DF Säule* überführt wurde (800 µl/Säule), ließ man sie auf Raumtemperatur abkühlen. Nach 30 s Zentrifugieren bei voller Umdrehung der Zentrifuge (17.000 g) wurde der Durchfluss verworfen und das *DF Säulchen* zurück in das Sammelgefäß gesetzt. Zum

Waschen wurden 600 µl des ethanolhaltigen Waschpuffers auf das Säulchen gegeben und nach einer 1-minütigen Einwirkzeit 30 s bei voller Umdrehung (17.000 *g*) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Probe ein weiteres Mal gewaschen. Zum Trocknen wurde die Probe für 3 min zentrifugiert und die Säule anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Zum Herauslösen der DNA aus der Membran wurden 40 µl *Elutionspuffer* direkt in die Mitte der Säule pipettiert, die Probe 2 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 2 min zentrifugiert. Zur Kontrolle wurden 5 µl der gereinigten DNA auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 3.1.3 Aufreinigen von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Zum Aufreinigen von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurde das *QIA Prep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten 4 ml mit Ampicillin versetztes LB-Medium, welches mit der gewünschten Bakterienkultur beimpft und für ca. 16 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert wurde. 2 ml dieses Ansatzes wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und durch 3-minütiges Zentrifugieren bei 6.800 *g* pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und durch die Zugabe von 250 µl *Puffer P1* konnte das Pellet resuspendiert werden. Anschließend wurden zunächst 250 µl *Puffer P2* und danach *Puffer N3* hinzugegeben und der Ansatz jeweils durch Invertieren vermischt. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 17.900 *g* wurde der Überstand vorsichtig auf das Säulchen (*QIAprep 2.0 spin column*) gegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 60 s bei 17.900 *g*, wurde der Durchfluss verworfen und zum Waschen 500 µl *Puffer PB* und anschließend 750 µl *Puffer PE* hinzugegeben. Nach dem Trocknen der Membran durch 60-sekündiges Zentrifugieren wurde das Säulchen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die Plasmid-DNA mit 50 µl *Puffer EB* eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 3.1.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab

Es wurde eine Vorkultur über 8 h angelegt. Hierfür wurden 4 ml mit Ampicillin versetztes LB-Medium mit der gewünschten Bakterienkultur beimpft und bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 50 µl entnommen und in 50 ml mit Ampicillin versetztes LB-Medium überführt, um weitere 16 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert zu werden. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Gefäß überführt und bei 6.000 *g* für 15 min zentrifugiert. Durch Abkippen des Überstandes wurde das Bakterienpellet freigelegt und mit 4 ml *Puffer P1* resuspendiert. Anschließend wurden zunächst 4 ml *Puffer P2* und darauf folgend 4 ml

*Puffer S3* dazugegeben und jeweils durch Invertieren gut gemischt. Die Suspension wurde in eine *QIAfilter Cartridge* des Kits überführt und nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch den Filter in ein neues 50 ml Gefäß überführt. Nach Zugabe von 2 ml *Puffer BB* und Invertieren wurde das Filtrat in ein *QIAGEN Plasmid Plus Midi Säulchen* überführt und anschließend mit 0,7 ml *Puffer ETR* und 0,7 ml *Puffer PE* gewaschen. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte für jeweils 1 min bei 17.900 g, wobei jeweils der Durchfluss verworfen wurde. Die Säulchen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß gesetzt und die Plasmid-DNA mit 200 µl Endotoxin-freiem Wasser eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C

### 3.1.5 Konzentrationsbestimmung DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Absorptionsmessung im UV-Bereich mit Hilfe eines Photometers (Eppendorf). Hierfür wurde die DNA verdünnt und in eine Quarzküvette (Eppendorf) pipettiert. Bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) konnte die optische Dichte bestimmt werden. Als Leerwert (*Blank*) diente der Lösungspuffer der DNA, welcher im selben Verhältnis wie die DNA verdünnt wurde.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = OD_{260} \times E \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000 \mu\text{l}$$

$$E = \text{Extinktionskoeffizient}; E_{\text{DNA}} = 50 \mu\text{g}$$

Durch die Bestimmung der  $OD_{280}$  konnte ebenfalls eine Aussage zur Reinheit der DNA getroffen werden. Hierfür wurde der Quotient von  $OD_{260} / OD_{280}$  bestimmt. Dieser sollte in DNA-Proben bei 1,7 – 2,0 liegen.

### 3.1.6 Konzentrationsbestimmung RNA

Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA wurde zum einen nach derselben Methode bestimmt, wie für die DNA-Proben beschrieben. Hierbei ist zu beachten, dass der Extinktionskoeffizient für RNA 40 µg beträgt. Die Reinheit der RNA ist mit einem  $OD_{260} / OD_{280}$  Quotienten von mehr als 1,8 als gut zu bezeichnen.

Eine weitere Möglichkeit zur Konzentrationsbestimmung von RNA-Proben bestand mit dem *Qubit Fluorometer* (Life Technologies). Während bei der oben beschriebenen Methode die Konzentrationsangabe durch Verunreinigung der RNA-Proben mit Protein und DNA

verfälscht sein kann, detektiert das *Qubit RNA BR Assay Kit* (Life Technologies) selektiv nur die vorhandene RNA. Hierfür wurde zunächst das *RNA BR Reagenz* mit dem *RNA BR Puffer* im Verhältnis 1:200 angesetzt. Zu 195 µl dieser *working solution* wurden 5 µl der z.T. verdünnten RNA-Proben gegeben. Der Ansatz wurde 2-3 s gevortext und anschließend 2 min ruhen gelassen, bevor die Konzentrationsbestimmung im *Qubit 2.0 Fluorometer* erfolgte.

## 3.2 Methoden zur Isolierung und Aufarbeitung von RNA

Bei der Arbeit mit RNA ist besondere Sorgfalt geboten. RNA ist sehr empfindlich gegenüber ubiquitär vorhandener RNasen. Diese führen zu einer Degradation der RNA, was zu einem erheblichen Qualitätsverlust führen kann. Aus diesem Grund wurden alle hitzestabilen Materialien vor Verwendung hitzesterilisiert und die Arbeitsfläche, Pipetten, Racks und weitere Arbeitsmaterialien mit *RNaseZap Wipes* (Ambion über Life Technologies) oder *RNase Away Reagent* (Ambion über Life Technologies) gereinigt. Die Arbeitsschritte wurden, soweit dies möglich war, bei 4 °C / auf Eis durchgeführt, da RNasen bei diesen niedrigen Temperaturen eine geringere Aktivität aufweisen.

### 3.2.1 Probenmaterial

Um die *Organic Anion Transporting Polypeptides* der Leber bei verschiedenen Tierarten zu untersuchen, wurden unterschiedliche Ausgangsmaterialien verwendet. Die Herkunft und Gewinnung wird in den folgenden Kapiteln erläutert.

#### 3.2.1.1 Leberproben Hunde

Als Ausgangsmaterial für viele in dieser Arbeit verwendete Methoden wurden Leberbiopsieproben von Hunden verschiedener Rassen genutzt. Die Gewinnung der Proben erfolgte nicht extra für diese Studie. Sie wurden im Rahmen von diagnostischen Maßnahmen in der Klinik für Kleintiere, Chirurgie, der Justus-Liebig-Universität Gießen nach medizinischer Indikation entnommen. Nach Abschluss der diagnostischen Untersuchungen wurde das Restmaterial, welches im Normalfall einfach entsorgt worden wäre, in ein mit *RNAlater* (Ambion) gefülltes 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Probenmaterial variierte z.T. stark in Gewicht und Größe.



Informationen über Rasse, Geschlecht, Alter und Erkrankungen der Tiere konnten über das Patientenverwaltungssystem der Klinik in Erfahrung gebracht werden, da hier jedem Patienten eine individuelle mehrstellige Nummer zugeordnet ist. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde den Proben, ihrem Eingangszeitpunkt nach, eine fortlaufende Nummer zugeteilt.

**Tab. 3.1: Übersicht über die 48 Leberbiopsieproben von Hunde und Katzen, welche in dieser Arbeit untersucht wurden.**

Patienten Nr. der Klinik für Kleintiere	Probennummer (# Hund)	Rasse	Alter bei Probeentnahme (Jahre)	Geschlecht
72990	1	Englischer Cockerspaniel	1	männl. kastr.
74218	2	Golden Retriever	2	weibl. kastr.
76006	3	Katze	13	weibl. kastr.
70721	4	Golden Retriever	2	weibl. kastr.
76905	5	Rottweiler	2	männl.
76893	6	Hd. Mischling	14	männl. kastr.
74848	7	Englischer Cockerspaniel	13	weibl. kastr.
79749	8	Labrador Retriever	1	männl.
82382	9	Border Collie	2	weibl.
13962	10	West Highland White Terrier	15	männl.
82565	11	Hd. Mischling	11	weibl. kastr.
16472	12	Zwergpinscher	10	männl.
82054	13	Malteser	7	männl. kastr.
82968	14	Jack Russel Terrier	11	weibl.
82659	15	Tibet Terrier	13	männl.
84389	16	Tervueren	3	männl.
85840	17	Dackel	9	weibl.
87280	18	West Highland White Terrier	11	männl. kastr.
88997	19	Labrador Retriever	4	männl. kastr.
74777	20	Katze	20	weibl. kastr.
90029	21	Großer Münsterländer	11	männl.
92640	22	Hd. Mischling	13	weibl. kastr.
92881	23	Katze	12	männl. kastr.
99058	24	Hd. Mischling	13	männl. kastr.
101018	25	Jack Russel Terrier	13	weibl. kastr.
100438	26	Border Collie	7	weibl. kastr.
102826	27	Hd. Mischling	8	weibl. kastr.
103605	28	Austr. Shepherd	12	weibl. kastr.
105660	29	Dackel	8	männl. kastr.
108016	30	Spitz	6	weibl.
111316	31	Hd. Mischling	4	weibl. kastr.
111521	32	Chinese Crested Dog	6	männl.
112359	33	Katze	10	männl. kastr.

113340	34	Labrador Retriever	4	weibl.
114048	35	Portugiesischer Wasserhund	1	weibl.
114301	36	Landseer	1	männl.
115093	37	Hd. Mischling	6	männl.
9591	38	Wachtel	7	weibl.
116715	39	Hd. Mischling	2	weibl. kastr.
117136	40	Hd. Mischling	1	weibl.
117828	41	Parson Russel Terrier	10	weibl. kastr.
118152	42	Dt. Schäferhund	8	männl.
118629	43	Hd. Mischling	9	weibl. kastr.
120452	44	Foxterrier	3	männl.
122150	45	Boxer	7	männl. kastr.
12048	46	Dachshund	10	männl.

Die Qualität des Probenmaterials bzw. der daraus gewonnen RNA variierte z.T. stark. Dies konnte zum einen auf die unterschiedliche Größe bzw. Menge der Leberbiopsieprobe zurückgeführt werden, wodurch nicht immer die optimale Menge in der RNA-Isolation eingesetzt werden konnte. Zum anderen handelte es sich um erkrankte Tiere, die unter anderem auch Veränderungen in der Leber aufwiesen, wie z.B. Fettleber, Leberfibrose oder Lebertumor. Dies erklärt, warum nicht aus allen Proben das Target amplifiziert werden konnte und nicht alle Proben in der quantitativen *Real-Time PCR* eingesetzt wurden.

### **3.2.1.2 Ausgangsmaterial von Katze, Schwein, Pferd, Ratte und Rind**

Leberbiopsieproben von Katzen konnten ebenfalls, wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, von der Klinik für Kleintiere, Chirurgie, der Justus-Liebig-Universität Gießen bezogen werden.

Leberproben vom Schwein wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus-Liebig-Universität Gießen gewonnen. Auch hier wurde nach diagnostischen Untersuchungen, überschüssiges Material in *RNA/later* (Ambion) gelegt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Als Ausgangsmaterial für diese Studie standen für Pferd und Ratte aus vorrausgegangenen Arbeiten am Institut für Pharmakologie und Toxikologie bereits cDNA aus Leberproben zur Verfügung.

Der *Oatp1b4* des Rindes wurde bereits zuvor am Institut für Pharmakologie und Toxikologie kloniert. Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde er allerdings in den *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* Vektor subkloniert.

### 3.2.2 RNA Isolation aus Gewebe

Für die RNA-Gewinnung wurden jeweils ca. 10 mg Lebermaterial eingesetzt. Zum Zerkleinern der Proben wurde 1 ml *TriReagent* (Sigma) hinzupipettiert und die Leberstücke unter Verwendung von zwei beschichteten, ca. 5 mm im Durchmesser großen Kügelchen (*Lysing Matrix M*) im *FastPrep-24* von MPbio homogenisiert. Anschließend wurden durch zentrifugieren für 10 min bei 12.000 *g* die Zellreste von DNA, RNA und Proteinen getrennt. Die Zentrifugationsschritte erfolgten während der gesamten RNA Isolation bei 4 °C. Nach dem Abpipettieren des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 0,2 ml Chloroform hinzugegeben, durch kräftiges Schütteln gut vermischt und im Anschluss der Ansatz für 3 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Beim erneuten Zentrifugationsschritt über 15 min bei 12.000 *g* erfolgte eine Auftrennung in 3 Phasen. In der unteren rötlichen Phase befanden sich organische Bestandteile, wie Proteine, die Interphase beinhaltete die DNA und in der oberen wässrigen Phase war die RNA vorzufinden. Diese obere wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Anschließend wurden 0,5 ml kaltes Isopropanol zugegeben und für 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt über 10 min bei 12.000 *g* hatte sich ein Pellet, welches die RNA beinhaltete, am Boden des Eppendorf Gefäßes abgesetzt. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und das Pellet mit 75 %-igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Ethanol vollständig entfernt worden war, erfolgte das Lösen des Pellets in 10-20 µl ddH<sub>2</sub>O. Die gelöste RNA wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.3 RNA Isolation aus Zellen

Um Total-RNA aus stabil transfizierten Zellen zu gewinnen, wurden die Zellen in 6-Well Platten kultiviert bis ein gleichmäßiger, dichter Zellrasen gewachsen war. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin gelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysieren der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 1 ml *TriReagent* (Sigma) und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren bis zur vollständigen Lyse. Durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 15.000 *g* wurden die Zelltrümmer von DNA, RNA und Proteinen getrennt. Das weitere Verfahren entsprach der Vorgehensweise bei der RNA -Isolation aus Gewebe.

### 3.2.4 DNase-Verdau

Nach RNA-Isolation können Spuren genomischer DNA verbleiben. Um diese zu eliminieren erfolgte ein DNase-Verdau vor der weiteren Verwendung der RNA.

Hierfür wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet:

- **RNase-freie DNase I (Fermentas)**

RNA	1 µg
10 x Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	1 µl
DNase I, RNase-frei (1 u/µl)	1 µl
Ribolock	1 µl
DEPC behandeltes H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurde 1 µl 50 mM EDTA zugegeben. Nach einem weiteren Inkubationsschritt bei 65 °C für 10 min wurden 8 µl des Ansatzes in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und mit dem Protokoll des *SuperScript III First-Strand Synthesis Kit* (Invitrogen) weiter verfahren.

- **RNase free DNase I (Qiagen)**

RNA	5-10 µl
Puffer RDD	10 µl
DNase I stock solution	2,5 µl
DEPC behandeltes H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubiert und mit dem Protokoll des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) weiter verfahren.

### 3.2.5 RNA-Aufreinigung

Vor allem für die quantitative *Real-Time PCR* ist eine gute Qualität der RNA entscheidend. Aus diesem Grund wurde die RNA zuvor mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) aufgereinigt. Nach DNase-Verdau wurden 350 µl *RLT Puffer* (1 ml *RLT Puffer* wurde zuvor mit 10 µl β-Mercaptoethanol versetzt) und 250 µl 100 %-iger Ethanol zugefügt und gut gemischt. Der Ansatz wurde auf ein *RNeasy Mini spin Säulchen* gegeben und für 15 s bei ≥ 8.000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 500 µl *RPE Puffer* auf das Säulchen gegeben und erneut für 15 s bei ≥ 8.000 g zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit 500 µl *RPE Puffer*. Nach 2-minütiger Zentrifugation wurde das Säulchen in ein neues

Sammelgefäß umgesetzt und durch erneutes Zentrifugieren Reste des Waschpuffers entfernt. Das Eluieren der RNA erfolgte mit 40 µl ddH<sub>2</sub>O.

### 3.2.6 RNA-Quantifizierung mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer*

Mit dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent) können DNA, RNA, Zellen und Proteine untersucht werden. Hierbei kommt die automatisierte Kapillarelektrophorese mit *Lab-on-Chip*-Technologie zum Einsatz. An dieser Stelle wurde diese Methode statt der denaturierenden Agarosegelelektrophorese verwendet, um die RNA auf ihre Qualität hin zu überprüfen. Eine vergleichbare Qualität verschiedener RNA Proben ist vor allem für die Verwendung in der quantitativen *Real-Time PCR* von großer Bedeutung. Mit dem *RNA-6000-Nano-LabChip-Kit* kann total RNA (eukaryotisch und prokaryotisch) und mRNA untersucht werden. Hierbei werden mit Hilfe der Kapillarelektrophorese die einzelnen Fraktionen der RNA der Größe nach aufgetrennt und ein Elektropherogramm erstellt, indem die gebundene Fluoreszenz der RNA-Fragmente in Abhängigkeit von der Zeit gemessen wird. Abgeleitet von diesem Elektropherogramm wird von jeder Probe zusätzlich ein Gelbild erstellt. Anhand der Daten erstellt das System zu jeder Probe einen RIN-Wert (*RNA integrity number*). Dieser Wert gibt einen Anhaltspunkt über die Qualität der RNA, wobei ein niedriger Wert für einen hohen Grad der Degradierung und somit für eine schlechte RNA-Qualität steht. Der RIN-Wert reicht von 1 bis 10.

Vor Versuchsbeginn wurden alle Reagenzien des *RNA-6000-Nano-LabChip-Kits* für 30 min bei Raumtemperatur equilibriert und die *Priming Station* vorbereitet. Der Einsatz für den Chip wurde mittels eines, mit *RNase Away* gefüllten, Reinigungschips gesäubert.

Die einzelnen Arbeitsschritte stellten sich wie folgt dar:

- Vorbereitung *RNA Ladder*:

Der dem Kit beigegefügte *RNA Ladder* wurde in ein RNase freies Reaktionsgefäß umpipettiert und für 2 min bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurde er zu je 3 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

- Vorbereitung des Gels:

Zur Vorbereitung des Gels wurden 550 µl *RNA Gel Matrix* auf einen *spin filter* pipettiert und bei 1.500 *g* für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden Aliquots mit jeweils 65 µl angelegt. Diese wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb von 4 Wochen verbraucht.

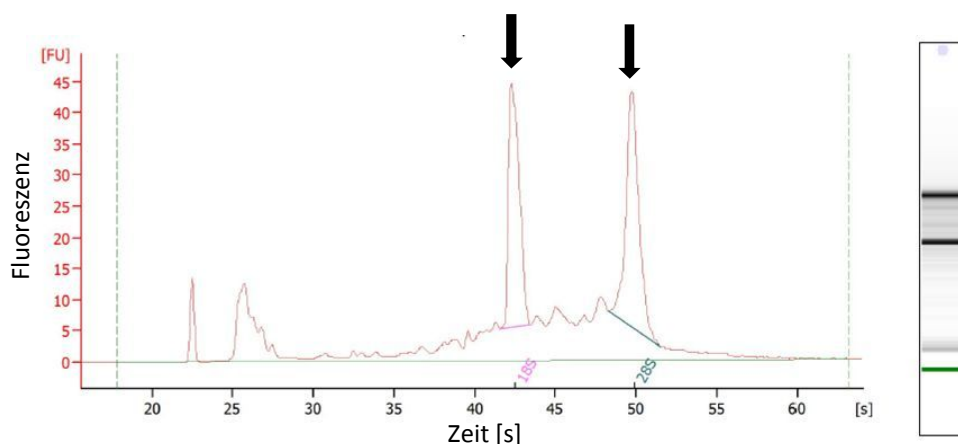
- Vorbereitung *Gel-Dye-Mix*:

Die Komponenten wurden vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. 1  $\mu$ l *RNA dye Konzentrat* wurde zu 65  $\mu$ l Gelaliquot gegeben. Durch Vortexen erfolgte die Mischung des Ansatzes, der anschließend 10 min bei 13.000 *g* zentrifugiert wurde.

- Füllen des Chips:

Ein neuer Chip wurde in die *Priming Station* eingebracht.

9  $\mu$ l des *Gel-Dye-Mixes* wurde in das mit G gekennzeichnete Well gegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstehen. Mittels Druck wird der *Gel-Dye-Mix* in den Kapillaren des Chips gleichmäßig verteilt. Jeweils weitere 9  $\mu$ l des *Gel-Dye-Mixes* wurden in zwei weitere, mit G gekennzeichnete Wells pipettiert. Jeweils 5  $\mu$ l des RNA Markers wurde in alle Proben-Wells und in das Ladder-Well pipettiert. Anschließend wurden 1  $\mu$ l des *RNA Ladders* und jeweils 1  $\mu$ l der RNA-Proben in das entsprechende Well gegeben. Wurden nicht alle Wells mit Proben gefüllt, wurden diese mit 1  $\mu$ l *RNA Marker* aufgefüllt. Der Chip wurde für 1 min gevortext und der Lauf innerhalb von 5 min gestartet.



**Abb. 3.1:** Darstellung des Elektropherogramms einer RNA nach Isolierung aus einer Leberbiopsie mit Hilfe des *Agilent 2100 Bioanalyzers*.

Auf der X-Achse ist die Zeit in Sekunden angegeben, auf der Y-Achse die gemessene Fluoreszenz. Der erste Peak stellt den Marker dar, die ribosomalen Peaks liegen für eukaryotische RNA bei 18S und 28S und sind in dem vorliegenden Elektropherogramm deutlich erkennbar (siehe Pfeile). Rechts wurde ein Gelbild der RNA anhand der Daten des Elektropherogramms erstellt. Der vom Programm errechnete RIN-Wert der abgebildeten RNA beträgt 8,3.

### 3.2.7 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Um aus der zuvor gewonnenen RNA cDNA zu synthetisieren, wurde das *SuperScript III First-Strand Synthesis Kit* (Invitrogen) verwendet.

Zunächst erfolgte ein DNase-Verdau mit *RNase-freier DNase I* (Fermentas). Zu 8  $\mu$ l des Ansatzes wurden 1  $\mu$ l *Random Hexamer Primer* und 1  $\mu$ l dNTPs zugegeben, sodass ein

Gesamtvolumen von 10 µl vorlag. Nach einer Inkubation für 5 min bei 65 °C wurde der Ansatz für mindestens 1 min auf Eis gestellt. In dieser Zeit wurde ein Master Mix entsprechend der Probenanzahl erstellt. Pro Probe wurden 2 µl 10 x *RT Buffer*, 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl *RNase OUT* benötigt. Der MM wurde zu dem 10 µl Ansatz hinzugefügt und im Anschluss wurde das Gemisch mit jeweils 1 µl der *Super Script III RT* versetzt. Nach gutem Durchmischen dieses 20 µl Ansatzes folgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur, es folgten weitere 50 min bei 50 °C und ein Stoppen der cDNA-Synthese durch ein 5-minütiges Erhitzen auf 85 °C. Nachdem 1 µl *RNase H* hinzugegeben wurde, folgte ein letzter Inkubationsschritt für 20 min bei 37 °C, bevor die fertige cDNA in 2 µl Aliquots portioniert wurde, sodass sie direkt für den Einsatz in der PCR zur Verfügung stand. Sollte die cDNA in einer *Real-Time PCR* zum Einsatz kommen, wurde sie mit 80 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

### 3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist es möglich spezifische DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Durch Auftrennung des DNA-Doppelstranges im Rahmen der Denaturierung, nachfolgender Anlagerung spezifischer Primer (*Annealing*) und der Primerelongation entstehen Duplikate des von den Primern flankierten DNA-Stranges. Die aus der Reaktion hervorgehenden PCR-Produkte dienen wiederum als Matrize für den nächsten PCR-Zyklus, sodass die Vervielfältigung der DNA nahezu exponentiell verläuft.

In dieser Arbeit wurde die PCR angewandt, um spezifische DNA-Sequenzen in dem Probenmaterial nachzuweisen und durch Sequenzierung zu untersuchen. Des Weiteren wurde die PCR zur Klonierungskontrolle, für Expressionsprofile und zur zielgerichteten Mutagenese genutzt. Nachfolgend werden die einzelnen, verwendeten PCR-Techniken beschrieben.

#### 3.3.1 Allgemeine Regeln zur Primerauswahl

Die Auswahl der Primersequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms *Oligo 4.0*. Hierbei wurden, sofern dies möglich war, folgende Rahmenbedingungen eingehalten:

- Die Primer trugen an ihrem 3'-Ende ein AC, AG, TC oder TG.
- Der (C+G)-Gehalt lag zwischen 50-60 %.
- Um Dimerbildungen zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass die Primer insbesondere am 3'-Ende nicht untereinander und nicht mit sich selbst komplementär waren.
- $\Delta G$  für Loopbildung war  $> 0$  um Sekundärstrukturen der Primer zu vermeiden.
- Die Schmelztemperatur der Primer wurde mit nachfolgender Formel berechnet:

$$T_m = 69,3 + 41 \times (\text{Anzahl G} + \text{Anzahl C}) / \text{Primerlänge} - 650 / \text{Primerlänge}$$

Die Länge der Primer betrug in der Regel 18 – 25 Basen. Bei den Schmelztemperaturen der zusammengehörigen Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurde darauf geachtet, dass sie möglichst ähnlich waren. Die Synthese der Primer wurde von der Firma *Metabion* (Martinsried) durchgeführt.

### 3.3.2 PCR-Reaktionsansatz

Abhängig von der PCR-Anwendung wurden unterschiedliche Polymerasen verwendet. Für die Generierung der *full-length* Amplifikate wurde die *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes) und das *Fast Start High Fidelity PCR System* (Roche) verwendet. Beide Polymerasen weisen eine 3' -> 5' Exonukleaseaktivität auf und haben somit eine sehr hohe Lesegenauigkeit. Die Kolonie-PCR diente dazu, die Integration und die Orientierung des Zielgens im Vektor zu überprüfen. Hierfür wurde der *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Scientific) verwendet, welcher eine Polymerase beinhaltet, die sehr schnell und mit einer hohen Lesegenauigkeit arbeitet und somit die Dauer der PCR deutlich verkürzt werden konnte. Für die TA-Klonierung ist ein A-Überhang am 3'-Ende des PCR-Produktes von Nöten. Dies ist durch die 3' -> 5' Exonukleaseaktivität der zuvor genannten Polymerasen nicht gegeben. Aus diesem Grund musste vor der Ligation des PCR-Produktes mit dem Vektor mit Hilfe der *DyNAzyme II DNA Polymerase* (Thermo Scientific) ein A-Überhang generiert werden.

Bei größeren Versuchsansätzen wurde aus den unten genannten Reagenzien ein Master Mix erstellt und zu jeder DNA-Probe gegeben. Die Proben wurden gemischt, kurz abzentrifugiert und in einem *Perkin-Elmer Gene Amp Cycler Typ 2400* (Perkin Elmer) oder *Thermocycler Primus 96 advanced gradient* (PeqLab) inkubiert. Für die Generierung der A-Überhänge mit



Hilfe der *DyNAzyme II DNA Polymerase* erfolgte die Inkubation bei 72 °C für 20 min im Wasserbad.

Die Reaktionsansätze für die einzelnen Polymerasen wurden wie folgt zusammengestellt:

	Phusion High Fidelity DNA Polymerase	Fast Start High Fidelity PCR System	Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	DyNAzyme II DNA Polymerase
Enzym	0,5 µl	0,5µl	10 µl	0,3 µl
Enzymbezogener Puffer	10 µl	5 µl	Im Mastermix enthalten	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Im Puffer enthalten	Im Puffer enthalten	-	-
dNTP-Mix (je 10 nM)	1µl	1 µl	Im Mastermix enthalten	-
dATP (10 nM)	-	-	-	0,2 µl
DMSO	-	2 µl	-	-
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	1 µl	0,5 µl	-
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µl	1 µl	0,5 µl	-
DNA (cDNA, Plasmid-DNA)	2 µl	2 µl	Eine gepickte Bakterienkolonie	10 µl des PCR-Produktes
ddH <sub>2</sub> O	Ad 50 µl	Ad 50 µl	Ad 20 µl	Ad 15 µl

### 3.3.3 Touchdown-PCR

Bei der Touchdown-PCR wird während der ersten Zyklen die Anlagerungstemperatur der Primer um 0,5 °C pro Zyklus gesenkt, um eine bessere Anlagerung der Primer zu erzielen. Dadurch wird eine hohe Spezifität in den ersten Zyklen erreicht und eine hohe Ausbeute bei der anschließend niedrigeren Anlagerungstemperatur.

	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
Denaturierung	98 °C	10 s
Anlagerung	(T <sub>m</sub> + 5 °C) – 0,5 °C pro Zyklus	30 s
Elongation	72° C	1 min/ 1 kb
Denaturierung	98 °C	10 s
Anlagerung	T <sub>m</sub> -Wert	30 s
Elongation	72 °C	1
Finale Elongation	72 °C	10 min
Kühlung	4 °C	∞

Das hier aufgeführte Protokoll ist für eine PCR-Reaktion mit der *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* ausgerichtet. Für die Anlagerungstemperatur wurde der niedrigere  $T_m$ -Wert der verwendeten Primer verwendet und um +5 °C erhöht. Die so berechnete Temperatur wurde in den ersten 10 Zyklen um jeweils 0,5 °C pro Zyklus reduziert. Die weiteren 30 Zyklen wurden dann bei konstanter Anlagerungstemperatur durchgeführt.

### 3.3.4 Nested-PCR Oatp1b4 des Hundes

Bei der Nested-PCR wird das PCR-Produkt einer vorab durchgeführten PCR als Matrize verwendet. Es wird ein Primer-Paar gewählt, das innerhalb der zuvor verwendeten Primer liegt. Dadurch kann die Ausbeute der gewünschten DNA-Sequenz deutlich erhöht werden.

Als Ausgangsmaterial für die Nested-PCR wurden aufgereinigte PCR-Produkte der verschiedenen Hunde verwendet und mit dem *Fast Start High Fidelity PCR System* folgendes PCR-Schema angewendet:

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	} X 10 Zyklen (-0,5 °C pro Zyklus)
Anlagerung	62 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2:15 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	} X 30 Zyklen
Anlagerung	57 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2:15 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	

### 3.3.5 Kolonie-PCR

Mit der Kolonie-PCR stand eine schnelle Methode zur Verfügung, Plasmide auf das Vorhandensein des Zielgenes (interessierendes Gen, *gene of interest*) hin zu untersuchen. Ebenfalls war die Überprüfung der Orientierung möglich. Dadurch war eine gezielte Aufreinigung der Plasmide möglich, welche das Zielgen in der richtigen Orientierung enthielten.

Folgendes Protokoll wurde für die Kolonie-PCR mittels *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix* verwendet:

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	
Denaturierung	98 °C	1 s	} 30 Zyklen
Anlagerung	59 °C	5 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	1 min	

### 3.3.6 PCR zur Generierung von 3'-A-Überhängen

Durch die 3'→5' Exonukleaseaktivität der *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* und des *Fast Start High Fidelity PCR Systems* werden keine 3'-A-Überhänge generiert. Diese sind bei der TA-Klonierung jedoch von Nöten. Aus diesem Grund wurden vor dem Einbringen des Zielgenes in den Vektor mittels der *DyNAzyme II DNA Polymerase* A-Überhänge an das PCR-Produkt angefügt. Hierfür wurden die PCR-Produkte mit den entsprechenden Reagenzien gemischt (siehe Kapitel 3.3.2) und für 20 min bei 72 °C im Wasserbad inkubiert.

### 3.3.7 Zielgerichtete Mutagenese

Das Zielgen wurde zunächst mit intaktem Stopcodon in den *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* Vektor kloniert. Da kein kommerziell erhältlicher Antikörper vorhanden war, mit welchem der canine *Oatp1b4* nachgewiesen werden konnte, bestand somit keine Möglichkeit des direkten Protein-Nachweises im *Western Blot* oder in der Fluoreszenzmikroskopie. Durch zielgerichtete Mutagenese wurde dann das Stopcodon entfernt. Somit konnte der *V5-tag* des Vektors abgelesen werden, gegen welchen verschiedene etablierte Antikörper zur Verfügung stehen.

Für die Durchführung der zielgerichteten Mutagenese wurde das *Q5 Site-Directed Mutagenese Kit* (NEB) verwendet.

#### 1. PCR

Q5 Hot Start High-Fidelity 2 x Master Mix	12,5 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	1,25 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	1,25 µl
DNA (1-25 ng/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	9 µl

Als DNA wurden die bereits generierten Plasmide mit dem *gene of interest* verwendet. Die Ausgangsplasmide wurden 1:1.000 verdünnt und jeweils 1 µl in die PCR eingesetzt.

Die Rückwärts-Primer wurden nach den allgemeinen Richtlinien zur Primerauswahl ausgesucht, wobei das Basen-Triplett, welches das Stopcodon codiert, heraus genommen wurde.

Folgendes Temperaturregime wurde mit einem Thermocycler durchgeführt:

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	10 s	} 25 Zyklen
Anlagerung	65 °C	20 s	
Elongation	72 °C	3:20 min	
Finale Elongation	72 °C	2 min	

## 2. Kinase, Ligase & *DpnI* (KLD) Behandlung

PCR-Produkt	1 µl
2 x KLD Reaction Puffer	5 µl
10 x KLD Enzyme Mix	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	3 µl

- Mischen und 5 min bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubieren

## 3. Transformation

Je 5 µl des obigen Ansatzes wurden auf *NEB5-alpha-Zellen* gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein *heatshock* bei 42 °C für 30 s, um die Transformation zu erreichen. Nachfolgend wurde der Ansatz weitere 5 min auf Eis ruhen gelassen bevor 950 µl vorgewärmtes S.O.C. Medium auf die Zellen gegeben und der ganze Ansatz bei 37 °C und 200 rpm über 1 h inkubiert wurde. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Suspension auf vorgewärmten LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und über 18 h bei 37 °C bebrütet. Die gewachsenen Kolonien wurden mittels Sequenzierung auf Erfolg der Mutagenese kontrolliert.

### 3.3.8 Quantitative *Real-Time PCR*

Die quantitative *Real-Time PCR* wurde verwendet, um die Expression des caninen *Oatp1b4* sowohl in Lebergewebe, als auch in stabil transfizierten Zellen zu bestimmen. Hierfür wurde das *Applied Biosystem 7300 Real TIME PCR System* verwendet. Bei den verwendeten *Gene Expression Assays* handelte es sich um bereits vorgefertigte Assays, die von Life Technologies bezogen wurden (siehe Kapitel 2.4). Sie enthalten zwei genspezifische Primer und eine kurze DNA-Sonde, die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff *FAM* markiert ist und am 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden *Quencher* besitzt. Ist die Sonde intakt, verhindert die räumliche Nähe des *Quenchers* zu dem Fluoreszenzfarbstoff *FAM* das Freisetzen des Fluoreszenzsignals. Während der PCR-Reaktion bindet die Sonde an dem komplementären DNA-Strang und wird bei der Elongation durch die 5' -> 3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase in Einzelnukleotiden abgebaut. Hierdurch werden *Quencher* und *FAM* räumlich voneinander getrennt, sodass die Fluoreszenz freigesetzt wird. Die Fluoreszenz wird von dem *Real-Time PCR* Gerät detektiert und quantifiziert. Die Stärke des Fluoreszenzsignals steigt dabei proportional mit der Vervielfältigung der DNA an und lässt sich in einem Funktionsgraphen darstellen.

#### Ansatz der quantitativen *Real-Time PCR*:

ddH <sub>2</sub> O	6,25 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	12,50 µl
TaqMan Gene Expression Assay	1,25 µl
cDNA	5,00 µl

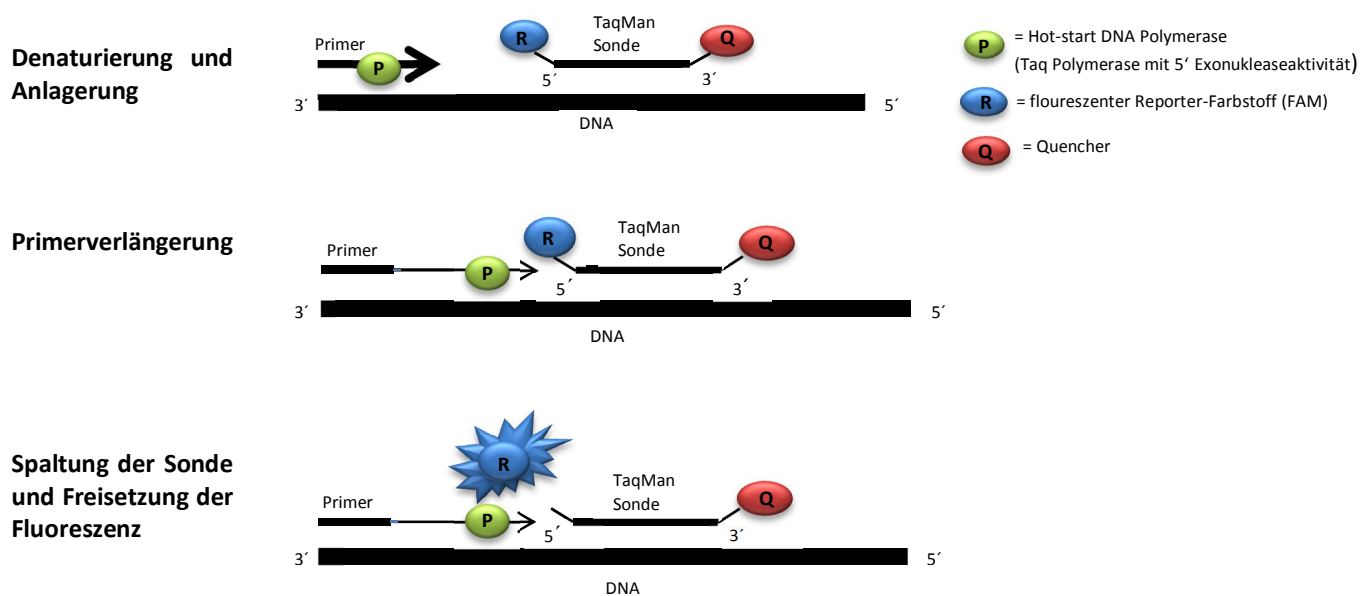
Aus ddH<sub>2</sub>O, *TaqMan Master Mix* und *TaqMan Assay* wurde der Probenzahl entsprechend ein Master Mix angesetzt und in eine 96 Well Platte vorgelegt. Anschließend wurde in einem Dreifachansatz die entsprechende cDNA hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach Verschluss der Platte mit einer Adhäsionsfolie erfolgte ein Abzentrifugieren mit Hilfe eines Plattenrotors, bevor die Reaktionsplatte in den *ABI PRISM 7300* gegeben wurde und die Reaktion nach folgendem Protokoll gestartet wurde:

Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 s	} 45 Zyklen
Primer-Anlagerung und Elongation	60 °C	1 min	
Kühlung	4 °C		

Bei den Expressionsprofilen der Hundeleber-Proben wurden als endogene Kontrollen canines ACTB und B<sub>2</sub>M eingesetzt. Als Kontrollgene für die Expressionsprofile der HEK293 Zellen dienten humanes ACTB und GAPDH.

Die Expression des jeweiligen Targets wurde mit Hilfe der  $\Delta C_t$ -Methode ermittelt indem der  $C_t$ -Wert der endogenen Kontrolle von dem  $C_t$ -Wert des Oatp1b4 subtrahiert wurde. Der  $C_t$  (*signal threshold cycle*) gibt an, wann die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt.

Um die maximale Streuung der Expression in den Leberproben darzustellen, wurde die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Hierfür wurde der  $\Delta C_t$ -Wert der Probe mit der niedrigsten Expression von dem  $\Delta C_t$ -Wert der Probe mit der höchsten Expression subtrahiert und die Transformation nach der Formel  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  durchgeführt. Dieser Wert gibt die Streuung der Expression innerhalb der Proben als das n-fache an.



**Abb. 3.2: Prinzip der qualitativen *Real-Time PCR* mit dem TaqMan System.**

Bei der Denaturierung werden die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt. Nun können sich Primer und Sonde an der Zielsequenz anlagern. Durch die räumliche Nähe des Farbstoffes FAM (R, blau) zu dem Quencher (Q, rot) wird das Fluoreszenzsignal unterdrückt. Durch die Primerverlängerung gelangt die Taq-Polymerase (P) an das 5'-Ende der Sonde und kann diese durch ihre 5' → 3' Exonukleaseaktivität abbauen. Dadurch entfernen sich Quencher und FAM voneinander und das Fluoreszenzsignal kann nach Anregung von FAM detektiert werden.

### 3.4 DNA-Klonierung

Unter Klonierung versteht man die Integration von DNA in einen Vektor und deren Einbringung in eine Bakterienzelle. Durch eingebaute Antibiotikaresistenzgene in den Vektor können die Bakterien auf die Aufnahme des Plasmides hin selektioniert werden. Ferner ist es möglich, das Plasmid nach Vermehrung durch die Bakterien wieder zu isolieren.

#### 3.4.1 TOPO-Klonierung

Die interessierende DNA-Sequenz (GOI) wurde mittels PCR generiert und die PCR-Produkte im Anschluss aufgereinigt. Bei Verwendung der *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* musste vor Beginn der Klonierung noch ein 3'-A-Überhang mit Hilfe der *DyNAzyme II DNA-Polymerase* an das PCR-Produkt angehängt werden (siehe Kapitel 3.3.2). Für die Ligation kamen 4 µl des A-Überhang-Mixes zum Einsatz, welcher mit 1 µl *Salt Solution* und 1 µl Vektor (*pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO Vector*) vorsichtig gemischt wurde. Während der Inkubation bei Raumtemperatur über 30 min wurde das PCR-Produkt in den linearisierten TOPO-Vektor über die komplementären Enden ligiert/eingefügt. Dabei wird die Topoisomerase I an den beiden Enden des linearisierten Vektors abgespalten. 2 µl des Ligationansatzes wurden für die nachfolgende Transformation verwendet.

### 3.5 Transformation

Für die Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes in 50 µl chemisch kompetente *OneShot TOP10 E. coli* pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 30 min auf Eis ruhen gelassen, so dass sich Plasmid und Bakterien annähern konnten. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für exakt 30 s. Nach weiteren 2 min auf Eis wurde 250 µl vorgewärmtes S.O.C. Medium (Invitrogen) hinzugegeben und das Ganze bei 37 °C und 200 rpm über 1 h inkubiert. Anschließend wurde auf vorgewärmten LB-Ampicillin-Agarplatten 100 µl und 200 µl des Ansatzes ausplattiert und über 18 h bei 37 °C bebrütet. Durch das Ampicillin Resistenzgen war gewährleistet, dass sich nur die Bakterien vermehren, in welchen das gewünschte PCR-Plasmid eingebaut war. Die Kontrolle erfolgte über Sequenzierung und Kontroll-PCR.

### 3.6 Sequenzierung und Auswertung von Sequenzspuren

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde von den Firmen *GATC* (Konstanz) und *Microsynth AG* (Lindau) durchgeführt. Die empfohlene Konzentration für Plasmid-DNA lag bei 60-100 ng/μl. Die Konzentration wurde im Photometer bestimmt und 1,2 μg der Plasmid-DNA mit ddH<sub>2</sub>O vermischt und auf 20 μl aufgefüllt. Die Konzentration von PCR-Produkten wurde ebenfalls mit ddH<sub>2</sub>O eingestellt, allerdings auf 15-50 ng/μl. Die entsprechenden Sequenzierprimer wurden in der Regel separat in 1,5 ml Reaktionsgefäßen übersandt. Ihre Konzentration betrug 10 pmol/μl. Die Sequenzierergebnisse wurden von den Firmen online zur Verfügung gestellt und mit den Programmen *FinchTV* und *DNASTar* ausgewertet.

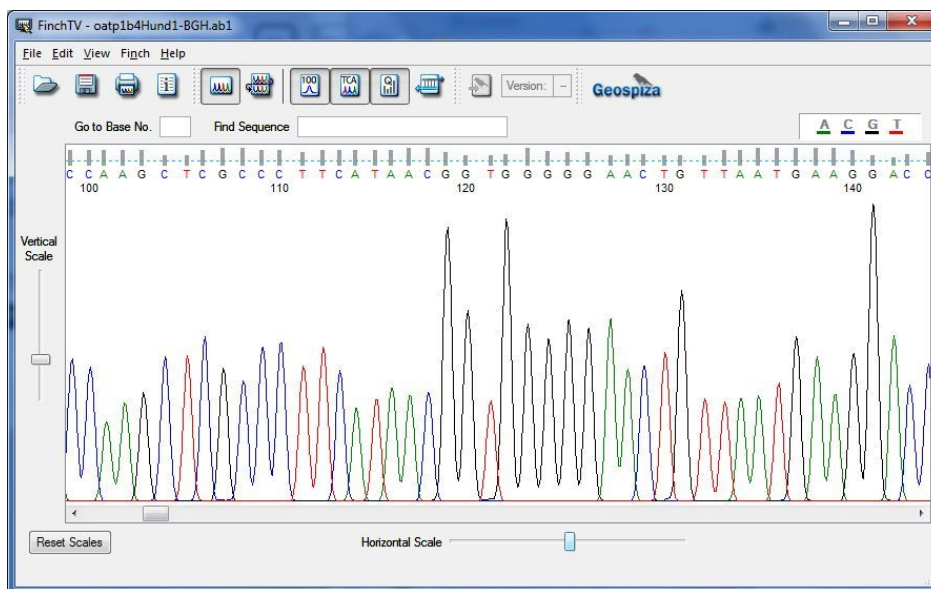


Abb. 3.3: Darstellung einer Sequenzspur mit dem Programm *FinchTV*.

### 3.7 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach den allgemeinen Techniken des sterilen Arbeitens. Dies bedeutet, dass sämtliche Arbeiten mit den Zellen unter einer sterilen *Laminar Flow* Sicherheitswerkbank durchgeführt wurden, welche regelmäßig mit UV-Licht bestrahlt wurde. Alle Materialien und Gegenstände, die mit den Zellen in Kontakt kamen wurden vor Verwendung gereinigt, desinfiziert und/oder sterilisiert bzw. autoklaviert.

Die Zellen wurden in ihrem entsprechenden Medium in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren mit 95 % Wasserdampfsättigung, 5 % bzw. 10 % CO<sub>2</sub> (MSR Zellen) und 37 °C kultiviert.



### 3.7.1 Passagieren der Zellen

Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, anschließend die Zellen 3-mal mit 5 ml PBS gewaschen. Das Lösen der Zellen erfolgte in einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturschale mit 1 ml 0,05 % Trypsin. Nach vollständigem Ablösen der Zellen unter Zugabe von 2 ml Medium wurde die Zellsuspension auf zwei Zellschalen aufgeteilt und zur Kultivierung jeweils auf 10 ml mit Medium aufgefüllt.

### 3.7.2 Aussähen der Zellen

Zum besseren Haften der Zellen wurden die zum Aussähen der Zellen vorgesehenen Mehr-Well-Platten mit Poly-L-Lysin beschichtet. Nach Ablösen der Zellen wurden 50 µl der Zellsuspension in 400 µl PBS geben. Nach Zugabe von 50 µl Trypanblau wurde ein Tropfen auf eine Zählkammer nach Neubauer aufgetragen und unabhängig voneinander drei Gruppenquadrate ausgezählt und somit die Zellzahl pro ml Suspension ermittelt.

Anschließend wurden in jedes Well 180.000 - 200.000 Zellen gegeben und für 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert bevor eine transiente Transfektion, oder im Falle von stabil transfizierten Zellen, eine Transportmessung durchgeführt wurde.

### 3.7.3 Kryokonservierung der Zellen

Es wurde 150 µl DMSO in ein *KryoPure Gefäß* (Sarstedt) vorgelegt. Nach Ablösen der Zellen wurde 1.350 µl der Zellsuspension zugegeben. Nach 5-6 h bei -20 °C wurden die *KryoPure Gefäße* für 18 h bei -80 °C weiter heruntergekühlt, bevor sie in flüssigem Stickstoff zur langfristigen Lagerung verbracht wurden.

### 3.7.4 Auftauen der Zellen

Die in *KryoPure Gefäße* eingefrorenen Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff genommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Kurz bevor die Zellen komplett aufgetaut waren, wurden die Zellen unter der Sterilwerkbank in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß umgefüllt und anschließend für 5 min bei 450 g pelletiert. Unter der Sterilwerkbank wurde der Überstand vorsichtig abgezogen und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturschale verbracht. Nachdem sich die Zellen gesetzt hatten, wurde das Medium gewechselt, um mögliche Reste des DMSO zu entfernen. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturschale überführt.

### 3.8 Transfektion eukaryotischer Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen eines Vektors, welcher das zu untersuchende Gen und einen Promoter beinhaltet, in eine Zelle. Dort dient die eingebrachte DNA-Sequenz der zelleigenen DNA-abhängigen RNA-Polymerase als Matrize für die Transkription einer protein-codierenden mRNA. Bei der transienten Transfektion wird das interessierende Gen (GOI) nur kurzfristig in die Zelle eingebracht, wohingegen bei der stabilen Transfektion eine dauerhafte Integration stattfindet und eine Weitergabe an die Tochterzellen erfolgt. Für längerfristige Untersuchungen bietet eine stabile Transfektion den Vorteil, dass eine gleichmäßige Expression des Proteins erfolgt und Schwankungen in der Transfektionsrate keine Rolle spielen.

#### 3.8.1 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion erfolgte in der Regel in 24-Well-Platten, in welchen die Zellen in ihrem entsprechenden Medium ohne Antibiotikum kultiviert wurden. Pro Well wurde 1 µg des entsprechenden Plasmids eingesetzt und mit *OptiMem I* auf jeweils 50 µl aufgefüllt. Des Weiteren wurde ein Ansatz mit 2 µl *Lipofectamine 2000* und 48 µl *OptiMem I* pro Well vorbereitet. Sowohl Plasmid-Ansatz, als auch *Lipofectamine 2000*-Ansatz inkubierten bei Raumtemperatur für 5 min, bevor 50 µl des *Lipofectamine 2000*-Ansatzes pro Well zu dem Plasmid-Ansatz gegeben wurde. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt über 20 min bei Raumtemperatur. Aus den mit Zellen vorbereiteten 24-Well-Platten wurden aus jedem Well 500 µl des vorhandenen Mediums abpipettiert, sodass 500 µl verblieben. Nun wurden 100 µl des Plasmid-*Lipofectamine 2000*-Gemisches in jedes Well zugegeben und die Zellen bei 37 °C für 24 h kultiviert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel, wobei Antibiotika in Form von Penicillin und Streptomycin und 2 mM Natrium-Butyrat zur Verstärkung der Expression hinzugefügt wurden. Nach weiteren 16 h wurde die Transportmessung mit radioaktiv markierten Substanzen oder eine Immunfluoreszenz-Untersuchung durchgeführt.

#### 3.8.2 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird das zu untersuchende Gen dauerhaft in das Genom der Zelle integriert. Hierfür wurden spezielle *Flp-In T-REx*-Zelllinien verwendet, in deren Genom eine *FRT site* (Flp Recombination Target) eingebracht ist. Das GOI wird zunächst in einen Expressionsvektor kloniert, welcher ebenfalls eine *FRT site* besitzt, bevor es zusammen mit

dem *pOG44*-Vektor in die Zellen kotransfiziert wird. Der *pOG44*-Vektor kodiert für die *Flp-Rekombinase*, welche die Integration des Expressionsplasmids in das Genom der Zelle über die *FRT site* vermittelt. Das Plasmid mit dem GOI enthält darüber hinaus ein Hygromycin-Resistenzgen, über welches erfolgreich transfizierte Zellen selektioniert werden können.

In dieser Arbeit wurden *rOatp1b2*, *cfOatp1b4* und *cfOatp1b4\**, welche in den Expressionsvektor *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* kloniert wurden, stabil transfiziert. Die FlpIn Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90 % in 6-Well Platten kultiviert. 1 µg des Plasmids mit GOI wurde mit 7 µg *pOG44* Plasmid vermischt und mit *OptiMEM I* auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Separat wurde ein *Lipofectamin 2000*-Ansatz mit 24 µl *Lipofectamine 2000* und 26 µl *OptiMEM I* erstellt. Beide Ansätze wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie im Verhältnis 1:3 (Plasmid-Ansatz:*Lipofectamin 2000*-Ansatz) zusammengeführt wurden. Nach weiteren 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. 24 h später wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben, in eine mit Poly-L-Lysin beschichtete Petrischale (Ø 10 cm) umgesetzt. Durch Zugabe des Selektionsantibiotikums Hygromycin B (Endkonzentration 150 µg/µl) starben nicht-transfizierte Zellen ab. Nach 14-21 Tagen waren Einzelklone deutlich zu erkennen und konnten jeder einzeln in 12-Well Platten überführt werden. Hierfür wurden die Wells mit Poly-L-Lysin beschichtet und mit Hygromycin B Medium befüllt. Das Medium aus den Petrischalen wurde abgezogen, die Einzelklone mit PBS gewaschen und schließlich mit etwas Medium durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gelöst. Es wurden sowohl Einzelklone in ein Well der 12-Well Platte überführt, als auch Sammelklone, indem mehrere Einzelklone zusammen gelöst und umgesetzt wurden. Bei einer Konfluenz der Zellen von nahezu 100 % wurden sie in 12,5 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen umgesetzt und die weitere Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben.

### 3.9 Transportmessung an eukaryotischen Zellen

Für die Transportstudien wurden sowohl stabil, als auch transient transfizierte Zellen verwendet. Bei Aufnahmeversuchen mit transient transfizierten Zellen wurden GripeTite 293 MSR-, CHO-, MDCK- oder HepG2-Zellen verwendet. Als stabil transfizierte Zellen standen die generierten FlpIn-HEK293-Zelllinien zur Verfügung. Bei beiden Transfektionsarten wurde 24 h vor dem Experiment die Proteinexpression in den Zellen mit 2 mM Natrium-Butyrat

gesteigert. Als Negativkontrollen dienten mit Leervektor transfizierte Zellen bzw. nicht-transfizierte FlpIn-HEK293-Zellen.

### **3.9.1 Ansetzen der Messlösungen und Vorbereitung der Zellen**

Die Messlösungen setzten sich aus einem radioaktiv markierten Anteil der Substanz und einem unmarkierten Anteil zusammen. Die gewünschte Menge der radioaktiven Stammlösung wurde in natriumhaltigen Transportpuffer im Wasserbad bei 37 °C gelöst. Die unmarkierte Substanz wurde verwendet, um die Konzentration der Messlösung einzustellen. Die Substanz wurde mittels Feinwaage abgewogen und in natriumhaltigem Transportpuffer oder DMSO gelöst. Da DMSO zelltoxisch ist, wurde beachtet, dass die Endkonzentration in der Messlösung weniger als 0,5 % betrug. Dazu wurde die Substanz in DMSO vorgelöst und anschließend die Konzentration in natriumhaltigem Transportpuffer eingestellt.

Die Zellen wurden für die Radioaktivmessungen in 24-Well Platten kultiviert. Für eine bessere Handhabung während des Versuchs wurden die Platten vor der Messung mit Hilfe eines heißen Drahtes in Cluster oder einzelne Wells geschnitten.

### **3.9.2 Aufnahmeversuch**

Zunächst wurde das Zellmedium abgezogen und die Zellen vorsichtig 3-mal mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Anschließend wurden 250 µl natriumhaltiger Transportpuffer auf die Zellen gegeben und für 15 min bei 37 °C vorinkubiert. Nach der Equilibrierung wurde der Transportpuffer abgezogen und die Transportmessung durch Zugabe der vorgewärmten Messlösung gestartet. Mittels Stoppuhr erfolgte die Überwachung der Aufnahmezeiten. Während der Messung standen die 24-Well Platten auf einer Wärmeplatte bei 37 °C, wobei durch untergelegte Aluplatten eine gleichmäßige Wärmeverteilung gewährleistet wurde. Die Aufnahme wurde durch Abkippen der Messlösung und 5-maligem Waschen mit eiskaltem PBS gestoppt.

### **3.9.3 Flüssigkeitsszintillationsmessung**

Das Lysieren der Zellen nach der Aufnahmemessung erfolgte durch Zugabe von 400 µl Lysepuffer und Inkubation bei 37 °C im Brutschrank über 16-18 h. 300 µl des Zelllysats wurden in ein Minivial gegeben und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit durch Vortexen gründlich gemischt. Die zellassoziierte Radioaktivität wurde anschließend im

Flüssigszintillationscounter gemessen. Das restliche Zelllysate wurde für die Proteinbestimmung verwendet.

### 3.9.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Lowry (LOWRY et al. 1951). Hierfür wurden 3-mal 20 µl des Zelllysats in die Wells einer 96-Well Platte pipettiert. In jedes Well wurden 200 µl *Lösung C* zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Zugabe von 40 µl *Folinreagenz* erfolgte. Nach zweistündiger Inkubation wurde die Extinktion der Farbreaktion bei 655 nm im *ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)-Reader* gemessen. Bei jeder Proteinbestimmung wurde eine Standardreihe mit definierten Proteinkonzentrationen (0-800 µg) mitgeführt. Auch hier erfolgte eine Dreifachbestimmung. Aus den Extinktionswerten der Standardreihe konnte eine Eichgerade generiert werden, mittels welcher die Proteinkonzentration der Proben bestimmt wurde.

### 3.9.5 Auswertung der Aufnahmeversuche

Die aufgenommene Menge an Radioaktivität wurde mittels Flüssigszintillationsmessung ermittelt und durch Zuhilfenahme von Substanz-spezifischen Umrechnungsfaktoren und unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils radioaktiv markierter Substanz in der Messlösung die Menge der aufgenommenen Substanz bestimmt. Diese wurde ins Verhältnis zu der ermittelten Proteinkonzentration der jeweiligen Probe gesetzt. Somit erfolgte die Angabe der aufgenommenen Substanzmenge in pmol/mg Protein. Für die graphische Darstellung und statistische Auswertung wurde das Programm *GraphPad Prism 6* verwendet.

## 3.10 *Xenopus laevis* Oozyten

Als weiteres Expressionsmodell wurden *Xenopus laevis* Oozyten verwendet. Die Eizellen (Oozyten) weiblicher, südafrikanischer Krallenfrösche werden häufig verwendet, um die heterologe Expression von Membranproteinen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden die *Xenopus laevis* Oozyten als alternatives Modell zur Zellkultur für Transportmessungen eingesetzt.

### 3.10.1 cRNA-Synthese

Für die cRNA-Synthese wurden die V5-His-Plasmide der verschiedenen Transporter verwendet. Der *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* Vektor besitzt einen *T7-Promoter*, welcher die Synthese einer komplementären RNA (cRNA) ermöglicht. Damit weder das *V5-Epitop* noch das *His-Tag* translatiert wurde, fanden die Plasmide Verwendung, welche ein intaktes Stopcodon beinhalteten.

Zunächst wurden die Plasmide mittels Restriktionsenzymen linearisiert. Dabei wurde beachtet, dass das Enzym nur einmal im Vektor möglichst nahe am Stopcodon schneidet, das Zielgen jedoch intakt bleibt. Diese Bedingungen wurden für alle Plasmide mit dem Restriktionsenzym *Kpn I* erfüllt. Die Reagenzien für den Restriktionsverdau wurden wie folgt angesetzt und für 1,5 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert:

Plasmid-DNA	5 µg in x µl
10 x FastDigest Buffer	5 µl
FastDigest <i>Kpn I</i>	5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Durch den Verdau entstehen 3'-Überhänge. Um diese abzubauen wurde der Ansatz mit *Klenow*-Fragment versetzt, sodass glatte Enden entstehen und die DNA korrekt von der RNA-Polymerase abgelesen werden konnte. Die 50 µl aus dem Restriktionsverdau wurden mit 3,6 µl dNTP-Mix und 1 µl *Klenow*-Fragment versetzt und bei 25 °C für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zufügen von 2 µl 0,5 M EDTA und Inkubation über 20 min bei 72 °C gestoppt. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von Phenol gefällt und mit Ethanol präzipitiert. 50 µl des Ansatzes wurde mit 50 µl *TE Puffer* (Qiagen) vermischt und zu bereits vorgelegtem Phenol (100 µl) gegeben. Nach 30 s Puls-Vortexen erfolgte eine 2-minütige Zentrifugation bei 13.200 *g*. Die obere Phase, welche die DNA enthält, wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß umpipettiert und erneut 100 µl Phenol hinzugegeben. Es folgte abermals ein 30-sekündiges Puls-Vortexen und anschließend eine Zentrifugation für 5 min bei 13.200 *g*. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat und 2,5-fachem Volumenanteil 100 %-igem Ethanol durch mehrfaches invertieren vermischt. Der Ansatz wurde 1 h bei -20 °C ruhen gelassen. Anschließend wurde die DNA durch 15-minütige Zentrifugation bei 13.200 *g*

pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach Zugabe von 500 µl eiskaltem 70 %-igem Ethanol wurde erneut für 15 min bei 13.200 g zentrifugiert und der Überstand wiederum vorsichtig abgenommen, bevor das Pellet mittels Vakuum 3 min getrocknet wurde. Zum Lösen des Pellets wurde 5,5 µl *TE Puffer* verwendet. Eine Kontrolle der DNA erfolgte mit einem 1 %-igen Agarosegel. Die Konzentration der linearisierten DNA wurde im Photometer bestimmt und Aliquots zu je 1 µg bei -20 °C eingefroren. Das Umschreiben der DNA in RNA erfolgte mit dem *mMessage mMachin Kit* (Ambion by Life Technologies), welches eine DNA-abhängige RNA-Polymerase beinhaltet. 1 µg linearisierte Plasmid-DNA wurde mit 5 µl nukleasefreiem Wasser, 10 µl NTP/CAP-Mix, 2 µl 10 x Reaktionspuffer und 2 µl Enzym-Mix gemischt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl *TurboDNase* zugegeben und erneut bei 37 °C über 15 min inkubiert. Durch die *TurboDNase* wird noch vorhandene Plasmid-DNA abgebaut.

Um die Stabilität der cRNA zu erhöhen und die Translationseffizienz bei später folgenden Experimenten zu steigern, wurde im nächsten Schritt ein Poly-A-Schwanz an die RNA angefügt. Hierfür wurde das *Poly(A) Tailing Kit* (Applied Biosystems) verwendet. Zu 20 µl des *mMessage mMachin*-Reaktionsansatzes wurden 36 µl nukleasefreies Wasser, 20 µl 5-mal *E-PAP-Puffer*, 10 µl 25 mM MnCl<sub>2</sub> und 10 µl 10 mM ATP hinzugegeben und gut gemischt. Durch anschließendes Hinzufügen von 4 µl *E-PAP* (*E. coli* Poly-A-Polymerase) und 1-stündige Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion gestartet. Die neu synthetisierte cRNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Im weiteren Verlauf wurden mit dem Einsatz des *MEGAclean Kits* (Ambion by Life Technologies) Nukleotide, Proteine und Salze entfernt, um eine cRNA hoher Reinheit zu erhalten. Hierfür wurden 100 µl des Poly-A-Ansatzes mit 350 µl *Binding Solution* Konzentrat und 250 µl 100 %-igem Ethanol vermischt und auf einen beigefügten Filtereinsatz gegeben. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 12.100 g wurde der Durchfluss verworfen und 500 µl *Wash Solution* auf den Filtereinsatz gegeben. Es wurde erneut 1 min bei 12.100 g zentrifugiert und der Waschriff ein weiteres Mal wiederholt. Nach dem Trocknen durch 30 s zentrifugieren bei 12.100 g wurde der Filtereinsatz in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die cRNA mit 50 µl Elutionspuffer gelöst.

Zum Aufkonzentrieren der cRNA wurde eine Fällung mit 5 M Ammonium-acetat durchgeführt. Zu der cRNA wurde im Verhältnis 1:10 5 M Ammonium-acetat hinzugefügt und vorsichtig gemischt bevor 2,5 Volumenanteile Ethanol (100 %-ig) dazu pipettiert wurden und der Ansatz für 30 min bei -20 °C inkubiert wurde. Nach Zentrifugation für 15 min bei

16.100 g und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abgezogen und das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 16.100 g wurde der Überstand entfernt und das Pellet unter Verwendung von Vakuum bei 35 °C für 3 min getrocknet. Das Lösen des Pellets erfolgte mit 20 µl nukleasefreiem Wasser und die Konzentration der cRNA wurde mit dem Photometer bestimmt. Anschließend wurden Aliquots à 6 µl mit 0,1 µg/µl erstellt und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert. Zur Überprüfung der cRNA wurde 1 µl auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen.

### 3.10.2 Gewinnung der *Xenopus laevis* Oozyten

Die Oozyten wurden von weiblichen südafrikanischen Krallenfröschen gewonnen. Sie wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Claus am Institut für Tierphysiologie unter der Tierversuchsanzeige mit der Kennung JLU\_400 entnommen und innerhalb von 2 h an unsere Arbeitsgruppe gekühlt weitergegeben. In einer Petrischale wurden die Oozyten mit Pinzetten aus den Ovarresten gelöst und vereinzelt. Um die, die Oozyten umgebende Follikelhülle zu lösen, wurden die Oozyten in einer Kollagenase D Lösung bei 18 °C inkubiert. Dies geschah entweder über einen Zeitraum von 16 h mit 0,4 mg/ml Kollagenase D gelöst in *OR-2 Puffer*, oder für 2 h mit 2 mg/ml Kollagenase D. Anschließend wurde 3-mal mit *OR-2 Puffer* gewaschen und die Reaktion so gestoppt.

Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Oozyten nach folgenden Kriterien für die nachfolgende Injektion ausgewählt:

- Teilungsstadium 5 bis 6 mit einem Ø von 1 bis 1,2 mm
- Fleckenlose, glatte Oberfläche
- Scharf getrennte Hemisphären mit äquatorialer Aufhellung
- Guter, gleichmäßiger Turgor

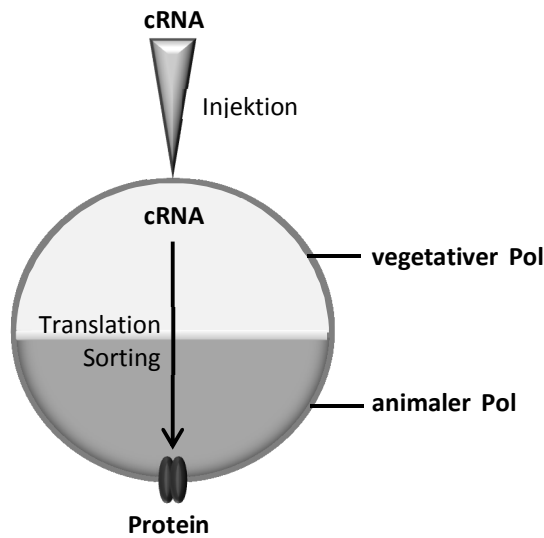
Die aussortierten Oozyten wurden bis zur Injektion mit *modifizierter Barth's Lösung*, versetzt mit 0,1 % Gentamicin, aufbewahrt.

### 3.10.3 Mikroinjektion der cRNA

Für die Injektion der Oozyten wurden Glaskapillaren mit einer Eingangsöffnung von 20-30 µm im Durchmesser vorbereitet und mit Mineralöl gefüllt, bevor sie auf dem Mikromanipulator fixiert wurden. Anschließend wurde die Kapillare 3-mal mit nukleasefreiem Wasser gespült, bevor 6 µl der entsprechenden cRNA bzw. Wasser als Negativkontrolle aufgezogen wurde. Um die Oozyten während der Injektion zu fixieren,



wurde eine Treppe vorbereitet, die in einer mit *modifizierter Barth's Lösung* gefüllten Petrischale (Ø 6 cm) befestigt war. Die Injektion der Oozyten erfolgte in den hellen, vegetativen Pol. Mittels einer elektrischen Nanoliterpumpe wurden in jede Oozyte 46 nl der cRNA (entspricht 4,6 ng) bzw. Wasser als Negativkontrolle injiziert. Anschließend wurden die Oozyten einzeln in 48-Well Platten gesetzt und 48-72 h in *modifizierter Barth's Lösung*, versetzt mit 0,1 % Gentamicin, bei 18 °C gelagert. Während dieser Expressionszeit wurde täglich der Puffer gewechselt und beschädigte oder abgestorbene Oozyten aussortiert.



**Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Mikroinjektion von cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten.**

Die *Xenopus laevis* Oozyten sind in einen vegetativen und einen animalen Pol aufgeteilt. Nach Injektion der cRNA in den vegetativen Pol erfolgt die Translation und der Einbau des fertigen Proteins in die Oozyten Membran.

### 3.10.4 Transportmessungen an Oozyten

Nach 48-72 h post injectionem wurden die Oozyten für die Transportmessung vorbereitet. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden vitale Oozyten in eine 24-Well Platte umgesetzt. Hierbei wurden pro Well 15-20 Oozyten einer cRNA (oder Wasser) zusammengesetzt, wobei ein Well einem Messpunkt bzw. einer Messlösung entsprach. Vor der Transportmessung wurden die Oozyten 3-mal mit Transportpuffer gewaschen. Anschließend wurde mit den nachfolgenden Protokollen weiter verfahren.

#### 3.10.4.1 Aufnahmeversuche

Nach Waschen der Oozyten wurden sie für 10 min in Transportpuffer equilibriert. Anschließend wurde der Transportpuffer vorsichtig abgesaugt und die entsprechende Messlösung auf die Oozyten gegeben. Die Messlösung setzte sich aus einem radioaktiv

markierten Anteil der Substanz und einem unmarkierten Anteil zusammen, welche in Transportpuffer gelöst wurden. Die Oozyten wurden eine Stunde in der Messlösung inkubiert und die Aufnahme gestoppt, indem die Messlösung vorsichtig abgesaugt wurde und die Oozyten 3-mal mit eiskaltem Transportpuffer gewaschen wurden. Es folgten zwei weitere Waschschrirte in mit eiskaltem Transportpuffer gefüllten Petrischalen, bevor die Oozyten in Minivials vereinzelt wurden. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 500 µl 10 %-igem SDS. Nach ca. 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 3 ml Szintillatoröl zugegeben und gründlich gevortext. Die aufgenommene Menge an Radioaktivität wurde mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung ermittelt und durch Zuhilfenahme von Substanz-spezifischen Umrechnungsfaktoren und unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils radioaktiv-markierter Substanz in der Messlösung die Menge der aufgenommenen Substanz bestimmt und in fmol/Oozyte/x min angegeben.

#### **3.10.4.2 Zeitreihe**

Zur Erstellung einer Zeitreihe wurden die Oozyten über einen definierten Zeitraum mit einer bestimmten Substanz Inkubiert. Die gewählten Zeiträume waren: 5 min, 15 min, 30 min, 60 min und 90 min.

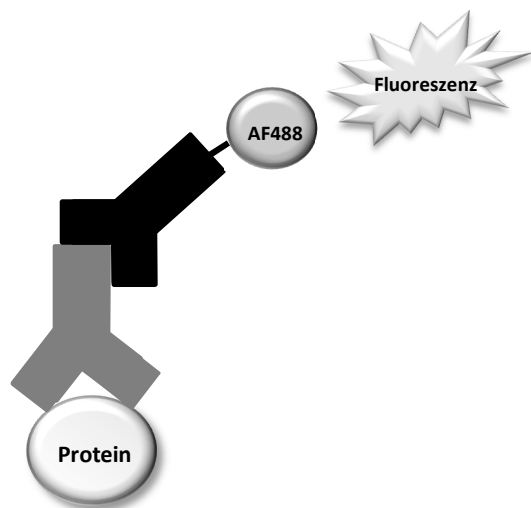
### **3.11 Immunfluoreszenz**

In dieser Arbeit wurden die V5-His-markierten Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Hierfür wurde der *Maus anti-V5-Antikörper* (Invitrogen) als Primärantikörper verwendet, welcher mittels Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Sekundärantikörper nachgewiesen werden konnte. Eine Färbung der Zellkerne wurde mit dem Farbstoff *DAPI* erzielt, welcher sich bei lebenden Zellen in die Furchen der DNA-Stränge einlagert.

#### **3.11.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit dem *Maus anti-V5-Antikörper***

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden MSR-293 und MDCK Zellen in 24-Well Platten auf Deckgläschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen transient mit den V5-His-Transporter-Konstrukten transfiziert und die Proteinexpression durch Zugabe von 4 mM Natrium-Butyrat 24 h vor Versuchsbeginn gesteigert. Als Negativkontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen.

48 h nach der Transfektion wurde das Zellmedium vorsichtig abgezogen und die Zellen 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 2 %-igem phosphatgepuffertem Paraformaldehyd (PFA) für 15 min. Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS für 2-mal 5 min wurde 500 µl *Puffer A* pro Well auf die Zellen gegeben und für 5 min inkubiert. Die Permeabilisierung erfolgte über exakt 5 min mit 0,2 % *Triton-X-100* gelöst in *Puffer A*. Das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde durch 30-minütiges Inkubieren der Zellen mit Blockierlösung, welche sowohl bovines Serumalbumin, als auch Ziegen Serum enthielt, erzielt. Anschließend wurde der Primärantikörper zugegeben. Der *Maus anti-V5-Antikörper* wurde im Verhältnis 1:5.000, gelöst in Blockierlösung, eingesetzt und über 1 h bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Durch 3-maliges Waschen mit PBS wurden Reste des Primärantikörpers entfernt, bevor der Sekundärantikörper auf die Zellen gegeben wurde. Auch der hierfür verwendete *Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelte anti-Maus Antikörper* (Invitrogen) wurde in Blockierlösung gelöst (Verhältnis 1:800). Er wurde 1 h bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen. Es folgten erneut drei Waschschritte mit PBS, bevor die Zellen 5 min mit DAPI/Methanol (1:5.000) inkubiert und anschließend 5 min mit Methanol fixiert wurden. Nach vollständigem Trocknen der Zellen wurde sie mittels *ProLong Gold Antifade* (Invitrogen) auf Objektträgern eingedeckelt. Die Lagerung der getrockneten Objektträger erfolgte bei 4 °C. Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers detektieren zu können, wurden Zellen nur mit Blockierlösung und Sekundärantikörper inkubiert.



**Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Proteinnachweises mittels Fluoreszenz-markiertem Antikörper.**

Der Primärantikörper (*Maus anti-V5*) bindet an das Protein (Oatp1b4), dieser wird wiederum von dem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (*Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelt anti-Maus*) erkannt. Nach Anregung unter dem Fluoreszenzmikroskop wird das Fluoreszenzsignal sichtbar, sodass eine räumliche Lokalisation des Proteins (beispielsweise in der Zellmembran) möglich ist.

### 3.11.2 Mikroskopie

Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte mit der Kamera *SW Kamera DFC 340 FX* des Fluoreszenzmikroskops *Leica DM5500B*. Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder wurde mit dem *LAS AF6000* mit *3D Deconvolution* von Leica Microsystems durchgeführt.

## 3.12 Western Blot

Die *Western Blot* Analyse wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Transportproteine in transient transfizierten Zellen nachzuweisen. Hierzu wurden die V5-His-markierten Proteine verwendet und mit dem Primärantikörper *Maus anti-V5* (Invitrogen) detektiert. Zur Kontrolle des Proteinauftrags der unterschiedlichen Proben wurde eine GAPDH-Analyse mit dem *Ziege anti-GAPDH* Antikörpers (Sigma-Aldrich) durchgeführt. Als Kontrollen dienten einerseits Proteine aus mit Leervektor transfizierten Zellen, und andererseits auf der Membran fixierte Proteine, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden.

### 3.12.1 Proteinextraktion mit *RIPA-Puffer*

Für die Gewinnung des Total-Proteins aus Zellen wurden diese zunächst in Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm) kultiviert. Die transiente Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz der Zellen von 70-80 %. Nach 48 h schloss sich die Proteinextraktion an. Auch aus stabil transfizierten Zellen wurden mittels *RIPA-Puffer* (Sigma-Aldrich) Proteine extrahiert. Hier wurde bei einer Dichte der Zellen von nahezu 100 % mit der Proteinextraktion begonnen.

Zunächst wurde das Zellmedium vorsichtig abgezogen und die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde pro Petrischale 350  $\mu$ l *RIPA-Puffer* und 3,5  $\mu$ l *Protease-Inhibitor* (Fermentas) auf die Zellen gegeben. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis, wobei die Zellen durch wiederholtes Klopfen in der Petrischale gelöst wurden. Das Zelllysate wurde mit Hilfe eines Zellschabers in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer auf eine 2 ml Einmalspritze gesetzte Kanüle ( $\varnothing$  0,9 mm) wurde das *RIPA-Puffer*-Zelllysate-Gemisch mechanisch weiter zerkleinert. Nach weiteren 10 min Inkubationszeit auf Eis erfolgte ein Zentrifugationsschritt über 15 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und in ein neues vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels *BCA-Assay*.

### 3.12.2 Proteinextraktion mit Proteo Extract Native Membrane Protein Extraction Kit

Auch für diese Methode zur Proteinextraktion wurden die Zellen zunächst in Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm) kultiviert. Nach Abziehen des Zellmediums wurden die transfizierten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in ein 5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation für 10 min bei 100-300 *g* und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und das Zellpellet mit 3,5 ml eiskaltem Waschpuffer durch Schnipsen und Invertieren gelöst. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 min bei 100-300 *g* und 4 °C wurde der Waschschrift ein weiteres Mal durchgeführt. Zum Extrahieren der löslichen Proteine wurden zunächst 20  $\mu$ l *Protease Inhibitor Cocktail* vorsichtig auf das Zellpellet gegeben und anschließend mit 3 ml *Extraktionspuffer I* resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei 4 °C auf dem Drehrad folgte erneut ein Zentrifugationsschritt über 15 min bei 16.000 *g* und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser enthielt die löslichen Proteine. Nun wurden ein weiteres Mal 20  $\mu$ l des *Protease Inhibitor Cocktails* auf das verbliebene Pellet gegeben und dieses mit 2 ml *Extraktionspuffer II* resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C auf dem Drehrad wurde zentrifugiert (15 min, 16.000 *g*, 4 °C) und der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. In diesem Überstand waren membranassoziierte Proteine enthalten. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels *BCA Assay*.

### 3.12.3 Proteinbestimmung mittels *BCA Protein Assay Kit*

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Zelllysate erfolgte mittels *BCA Protein Assay Kit* (Novagen). Diese Methode hat den Vorteil, dass sie nicht von chemischen Verbindungen und Detergenzien beeinflusst wird. Zunächst wurde eine Standardreihe mit definierten Proteinmengen (0-1000  $\mu$ g) bestimmt, von welcher die Proteinkonzentrationen der Proben abgeleitet werden konnte. Die Proteinmessung erfolgte in Dreifachbestimmung. In 96-Well Platten wurden zunächst jeweils 25  $\mu$ l Standard oder Probe vorgelegt. Anschließend wurden pro Well 200  $\mu$ l *BCA Solution* und 4  $\mu$ l 4 % *Kupfersulfat-Lösung* gemischt und davon jeweils 200  $\mu$ l auf die vorgelegten Proben gegeben. Die Platte wurde mit einer Adhäsionsfolie verschlossen, für 30 s auf dem Plattenschüttler gemischt und dann bei 37 °C über 30 min inkubiert. Nach Abkühlen der Platte wurde die Absorption bei 570 nm im *ELISA-Reader* bestimmt. Mit Hilfe der durch die Standardreihe erstellten Eichgeraden konnte nun der Proteingehalt der einzelnen Proben extrapoliert werden.

### 3.12.4 Gellauf und Blotting

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel. Die gewünschte Proteinmenge wurde mit 4 x *Lämmli Puffer* im Verhältnis 1:4 versetzt und in der Regel auf 20 µl pro Aliquot mit *RIPA Puffer* aufgefüllt, bevor sie in die Kammern gegeben wurde. Zur Visualisierung wurde darüber hinaus 5 µl *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (MBI Fermentas) und zur exakten Größenbestimmung 5 µl *RotiMark Western Marker* (Roth) auf das Gel mit aufgetragen. Letzterer gibt nach Inkubation der geblotteten Membran mit *Roti Lumin I* und *II* (Roth) Chemilumineszenzsignale ab, die auf dem ECL-Film direkt detektierbar sind. Es wurde für ca. 16 h eine Spannung von 50 V an das befüllte SDS-Polyacrylamidgel angelegt, bis eine ausreichende Auftrennung der Proteine erfolgt war. Anschließend wurde das Sammelgel entfernt und neun Filterpapiere als auch die *Hybond ECL Nitrocellulose Membran* (GE Healthcare) auf die Größe des verbliebenen Trenngels zugeschnitten. Drei Filterpapiere wurden in konzentrierten Anodenpuffer gelegt, drei weitere Filterpapiere zusammen mit der Nitrocellulosemembran in Anodenpuffer und die verbliebenen drei Filterpapiere zusammen mit dem Polyacrylamidgel in Kathodenpuffer. Alle wurden in ihrem entsprechenden Puffer für 10 min inkubiert, bevor die Komponenten des *semi-dry* Blots nach folgendem Schema im *Perfect Blue „Semi-Dry“-Electroblotter* (PeqLab) aufgebaut wurden:

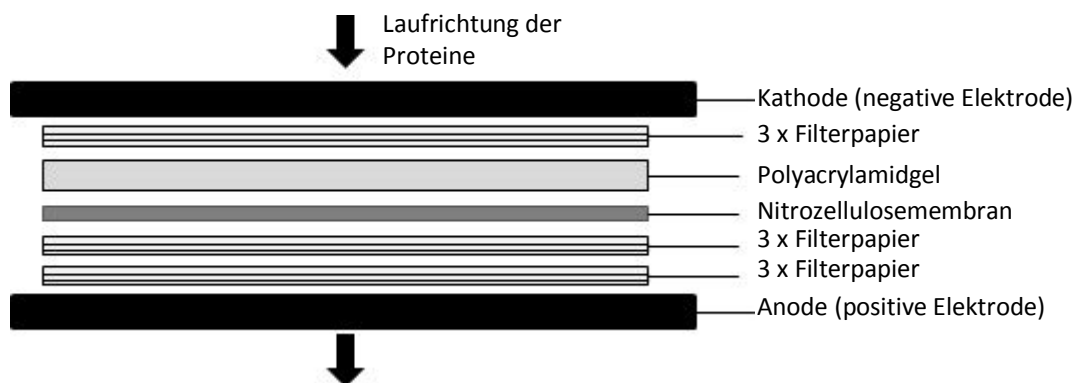


Abb. 3.6: Schematischer Aufbau des *Semi-Dry* Elektroblots

Eventuell eingeschlossene Luftblasen wurden mit Hilfe eines 50 ml Reaktionsgefäßes entfernt, indem vorsichtig mit dem Gefäß über das Gelsandwich gerollt wurde. Das Blotten erfolgte für 1-2 h. Die Stromstärke in mA berechnete sich nach der Größe der zu blottenden Gele in  $\text{cm}^2 \times 1,5 \text{ mA}$ . Hierbei werden durch ein Ladungsgefälle die Proteine aus dem Gel herausgelöst und auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Um den Übertritt der

Proteine auf die Membran zu überprüfen wurde die Membran in *Ponceau*-Lösung geschwenkt, welche die Proteine rot anfärbt. Anschließend wurde die Membran mit 1 x TBS-T gewaschen, bis die Färbung der *Ponceau*-Lösung wieder vollständig verschwunden war.

### 3.12.5 Blockierung der Membran und Antikörperreaktion

Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde Milchpulver verwendet. Bei einem 10 %-igem Ansatz, wurde dieser 30 min bei Raumtemperatur auf der Membran belassen, bei einem 5 %-igen Ansatz erhöhte sich die Inkubationszeit auf 1 h. Nach Abziehen der Blockierlösung wurde der 1. Antikörper, verdünnt in Blockierlösung, auf die Membran gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Primärantikörper kamen entweder der monoklonale *Maus anti-V5* (1:5.000, Invitrogen) oder der polyklonale *anti-GAPDH* (1:25.000, Sigma-Aldrich) zum Einsatz. Anschließend wurde die Membran 3-mal kurz und 2-mal für 15 min mit 1 x TBS-T gewaschen, bevor der Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben wurde. Als Sekundärantikörper dienten der *HRP Western Blot anti-Maus IgG Antikörper* (1:10.000, Rockland) und der *ZyMax Kaninchen anti-Ziege HRP Konjugat* (1:5.000, Invitrogen). Dem Sekundärantikörper wurde *RotiMark Western HRP-Konjugat* (1:5.000, Roth) zugefügt, um den Größenmarker auf dem ECL-Film sichtbar zu machen. Es folgten erneut drei kurze Waschschrte mit 1 x TBS-T über jeweils 5 min und weitere zwei über 15 min.

### 3.12.6 Detektion

Für die Detektion wurden *Roti Lumin I* und *II* im Verhältnis 1:1 vermischt und 5 min präinkubiert, bevor das Gemisch auf der Membran verteilt wurde. Dabei wurde beachtet, dass die Nitrocellulosemembran gleichmäßig benetzt war. Nach 1 min wurde das *Roti Lumin*-Gemisch entfernt und die Membran in eine durchsichtige Folie eingeschweißt. Dies verhindert ein Benetzen des ECL-Films durch verbliebenes *Roti Lumin* auf der Membran. Die Membran wurde für die Detektion in eine Dunkelkammer verbracht und dort auf einen *Amersham Hyperfilm ECL-Film* in einer Röntgenkassette gelegt. Die Chemilumineszenzsignale, welche letztendlich den Film belichten, entstehen durch die Reaktion des *Roti Lumins* mit der *Horseradish peroxidase* (HRP) des Sekundärantikörpers. Die Belichtungszeit betrug zwischen 1 und 10 min, abhängig von der Signalstärke der Proteine. Nach der Exposition wurde der Film für ca. 3 min im Entwicklerbad *Rodinal B & W Developer*

(Agfa) geschwenkt. Es folgte das Stoppen der Reaktion in 2 %-iger Essigsäure und das Fixieren für 5 min im *Hypam Schnellfixierer* (Ilford). Der Film wurde gewässert und getrocknet, bevor die Auswertung der Signale erfolgte. Die Proteingrößenbestimmung erfolgte mit Hilfe des *Roti Mark Western Markers*.



## 4 ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde bei verschiedenen Tierarten die in der Leber vorkommenden *Organic Anion Transporting Polypeptides* (Oatp) untersucht. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Subfamilie Oatp1b gelegt. Beim Menschen ist diese Subfamilie mit zwei Transportern vertreten (OATP1B1 und OATP1B3) und ist von großer Bedeutung bei der Aufnahme endogener und exogener Substanzen in die Leber. Zu den orthologen Transportern bei den verschiedenen Tierarten ist bislang nur wenig bekannt.

Mit dem zur Verfügung stehenden Probenmaterial der verschiedenen Tierarten wurden zunächst mittels RT-PCR die Sequenzen der jeweiligen Oatps isoliert und miteinander und, falls vorhanden, mit Referenzsequenzen verglichen. Anschließend folgte eine funktionelle Bewertung der Oatps im Zellkulturmodell. Der Oatp1b4 des Hundes wurde aufgrund der großen Anzahl an Proben (42) ausführlicher untersucht. Hierbei wurde der Fokus auf mögliche Polymorphismen in der cfOatp1b4-Sequenz gelegt, um diese dann funktionell zu untersuchen und mit dem Wildtyp zu vergleichen.

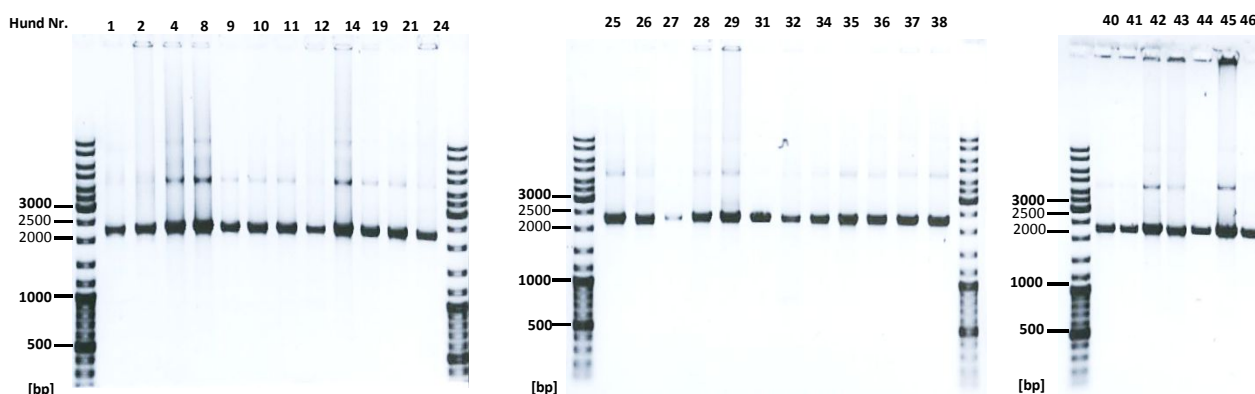
### 4.1 Der canine Oatp1b4-Transporter

#### 4.1.1 Polymorphismen im cfOatp1b4-Transporter

Der canine Oatp1b4 wurde 2010 von Gui und Hagenbuch erstmals beschrieben (Gui und Hagenbuch 2010). Die hierbei ermittelte Sequenz wurde für die nachfolgenden Studien als Referenzsequenz herangezogen (GenBank Accession No. GQ497899). Zunächst wurde der Oatp1b4-Transporter des Hundes auf das Auftreten von Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms* = SNPs) hin untersucht. Diese wurden nach ihrer Stelle im orf (*open reading frame*) der Referenzsequenz gekennzeichnet. Hierfür wurden in Zusammenarbeit mit der Kleintierklinik für Chirurgie an der JLU Gießen (Leiter Prof. Dr. Dr. hc. M. Kramer) über einen Zeitraum von zwei Jahren insgesamt 42 Leberbiopsieproben von Hunden unterschiedlicher Rassen zusammengetragen. Diese wurden im Rahmen klinisch-diagnostischer Untersuchungen gewonnen und wären als überschüssiges Material ansonsten verworfen worden.

Aus allen Proben wurde RNA isoliert, die anschließend in cDNA umgeschrieben wurde. Mittels genspezifischer Primer konnten dann *full-length* Amplifikate des Oatp1b4 eines jeden Hundes zur weiteren Bearbeitung generiert werden. Einige der Biopsien erfüllten die

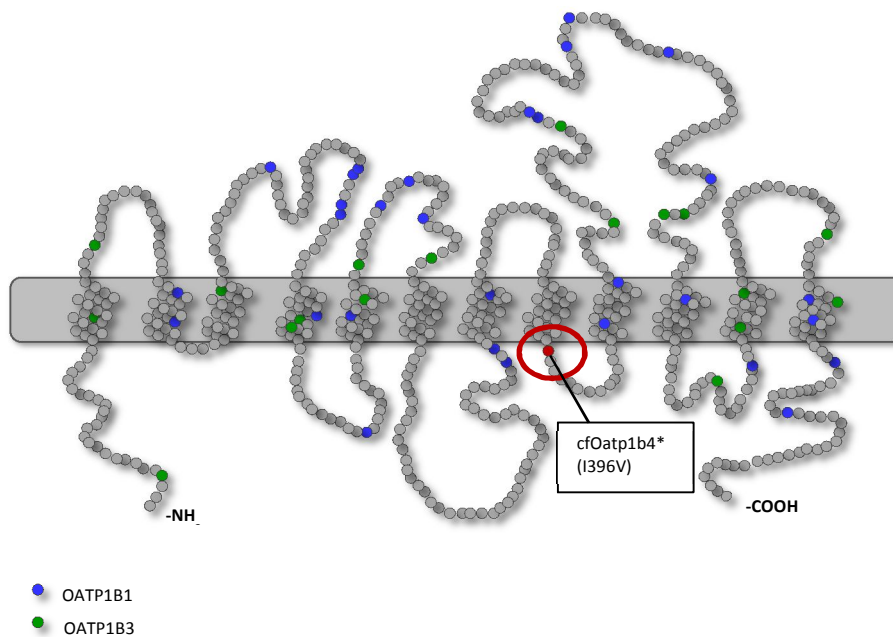
notwendigen Anforderungen an Qualität und Quantität jedoch nicht, so dass nicht alle Proben in der *full-length*-PCR eingesetzt werden konnten.



**Abb. 4.1: Darstellung der PCR-Produkte des cfOatp1b4 mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Es wurde jeweils 5 µl der Probe und 2 µl Ladebuffer (*Gene Ruler DNA Ladder Mix*; Thermo Scientific, Waltham, USA) auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Es erfolgte die Anfärbung der DNA mit *GelRed* (Biotium, Hayward, CA, USA) und die Visualisierung der PCR-Produkte unter UV-Licht. Die genspezifische Amplifikatlänge beträgt 2278 bp.

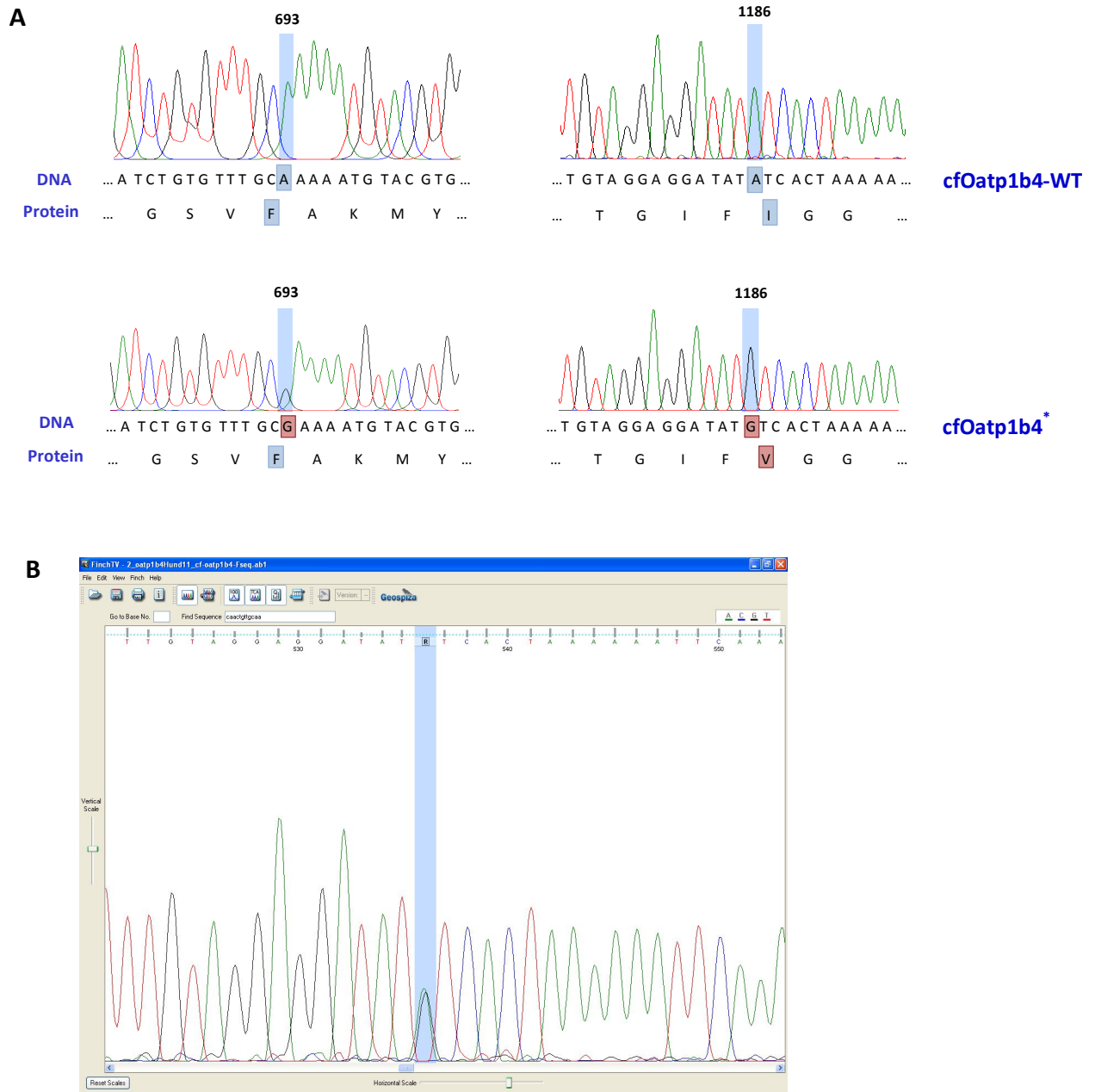
Die generierten cfOatp1b4-Amplifikate (siehe Abb. 4.1) wurden in den Vektor *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* (Invitrogen) kloniert und im Anschluss mittels Sequenzierung nach Plasmidpräparation auf Polymorphismen gescreent. Hierzu wurden von jedem Hund jeweils drei unabhängige Klone untersucht. Für die direkte Sequenzierung der PCR-Amplifikate ohne Klonierungsreaktion wurde eine *Nested-PCR* entwickelt, um die Endkonzentration der PCR-Produkte zu erhöhen und somit bessere Ergebnisse bei der Sequenzierung zu erzielen. Bei der Auswertung der Sequenzen wurde deutlich, dass der Oatp1b4 des Hundes im vorliegenden Probematerial nicht so polymorph auftritt, wie die verwandten Lebertransporter OATP1B1 und OATP1B3 des Menschen.



**Abb. 4.2: Schematische Darstellung eines *Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATP) mit 12 Transmembrandomänen**

Die nicht synonymen SNPs der humanen OATP1B1 und OATP1B3 sind in blau und grün dargestellt. Rot hervorgehoben ist der neu identifizierte nicht synonyme SNP im caninen Oatp1b4 an Position 396.

Von den 30 untersuchten Hunden zeigten 10 Hunde eine identische cfOatp1b4-Sequenz zu der Referenzsequenz (*GenBank Accession No.* GQ497899, im Folgenden cfOatp1b4-WT genannt). Bei 15 von 30 Hunden konnte ein homozygoter Haplotyp in Form von zwei parallel auftretenden Einzelbasenaustauschen (SNPs) identifiziert werden. Dieser neue Haplotyp wird im Folgenden als cfOatp1b4\* bezeichnet. Bei diesem Haplotyp wird sowohl an Position 693 als auch an Position 1186 Adenin durch Guanin ersetzt (693 A>G und 1186 A>G). Dies führt im Falle des SNPs an Position 1186 zu einem Austausch der Aminosäure Isoleucin zu Valin (I396V) (siehe Abb. 4.2 und 4.3 A). 5 der 30 Hunde stellten sich heterozygot für diesen Polymorphismus dar (siehe Abb. 4.3 B). Unter der *Accession No.* LN833579 wurde dieser neu identifizierte Haplotyp bei *GenBank* hinterlegt. Die entsprechende Sequenz ist insgesamt 2304 Basenpaare lang und enthält einen offenen Leserahmen von 2076 bp. Das codierte Oatp1b4\*-Protein hat, ebenso wie Oatp1b4-WT, eine Länge von 692 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ca. 85 kDa.



**Abb. 4.3: graphische Darstellung der SNPs 693 A>G und 1186 A>G im caninen Oatp1b4**

**(A)** Die obere Abbildung zeigt die Referenzsequenz (GQ497899) des caninen Oatp1b4-WT. In der unteren Abbildung sind in rot die Basenaustausche an den Positionen 693 und 1186 dargestellt. Der SNP an Position 1186 führt zu einem Austausch der Aminosäure (I396V). Darstellung mit Hilfe des Programms *FinchTV*.

**(B)** Ausschnitt aus dem Oatp1b4-Chromatogramm eines Hundes, der den heterozygoten Polymorphismus 1186 A>G aufweist. Man erkennt an Position 1186 deutlich die Überlagerung der Signale für Adenin (grün) und Guanin (schwarz).

**Tab. 4.1: Sequenzauswertung der untersuchten Leberbiopsie-Proben von 44 Hunden**

Neben der individuellen Patientennummer, welche von der Klinik für Kleintiere vergeben wurde und der internen Nummerierung der Proben, sind die Rassen, das Alter bei Probenentnahme und das Geschlecht aufgeführt. Ferner sind die Ergebnisse der Sequenzanalysen der Hundeproben angegeben, welche der Unterscheidung unterliegen, ob die Sequenz identisch zu der bereits bekannten cfOatp1b4 Sequenz (*GenBank Accession No.* GQ497899) ist oder dem neu entdeckten Haplotypen cfOatp1b4\* (*GenBank Accession No.* LN833579) in homozygoter oder heterozygoter Ausprägung entspricht. Bei einigen Proben konnte aufgrund der schlechten Quantität oder auch Qualität keine Sequenzanalyse durchgeführt werden, so dass bei diesen Proben kein Ergebnis eingetragen werden konnte (grau hinterlegt).

Patienten Nr. Klinik für Kleintiere	Proben- nummer (# Hund)	Rasse	Alter bei Probe- entnahme (Jahre)	Geschlecht	identisch mit Referenz- sequenz	Polymor- phismus 693 A>G & 1186 A>G homozygot vorhanden	Polymor- phismus 693 A>G & 1186 A>G heterozygot vorhanden
72990	1	Englischer Cockerspaniel	1	männl. kastr.		X	
74218	2	Golden Retriever	2	weibl. kastr.		X	
70721	4	Golden Retriever	2	weibl. kastr.	X		
76905	5	Rottweiler	2	männl.			
76893	6	Hd. Mischling	14	männl. kastr.			
74848	7	Englischer Cockerspaniel	13	weibl. kastr.			
79749	8	Labrador Retriever	1	männl.		X	
82382	9	Border Collie	2	weibl.	X		
13962	10	West Highland White Terrier	15	männl.	X		
82565	11	Hd. Mischling	11	weibl. kastr.			X
16472	12	Zwergpinscher	10	männl.	X		
82054	13	Malteser	7	männl. kastr.			
82968	14	Jack Russel Terrier	11	weibl.		X	
82659	15	Tibet Terrier	13	männl.			
84389	16	Tervueren	3	männl.			
85840	17	Dackel	9	weibl.			
87280	18	West Highland White Terrier	11	männl. kastr.			
88997	19	Labrador Retriever	4	männl. kastr.		X	
90029	21	Großer Münsterländer	11	männl.		X	
92640	22	Hd. Mischling	13	weibl. kastr.			
99058	24	Hd. Mischling	13	männl. kastr.	X		
101018	25	Jack Russel Terrier	13	weibl. kastr.			X
100438	26	Border Collie	7	weibl. kastr.		X	
102826	27	Mischling	8	weibl. kastr.		X	
103605	28	Austr. Shepherd	12	weibl. kastr.			X
105660	29	Dackel	8	männl. kastr.			X
108016	30	Spitz	6	weibl.			
111316	31	Hd. Mischling	4	weibl. kastr.		X	
111521	32	Chinese Crested Dog	6	männl.			
113340	34	Labrador Retriever	4	weibl.		X	
114048	35	Portugiesischer	1	weibl.		X	

		Wasserhund					
114301	36	Landseer	1	männl.		X	
115093	37	Hd. Mischling	6	männl.			X
9591	38	Wachtel	7	weibl.	X		
116715	39	Hd. Mischling	2	weibl. kastr.			
117136	40	Hd. Mischling	1	weibl.	X		
117828	41	Parson Russel Terrier	10	weibl. kastr.	X		
118152	42	Dt. Schäferhund	8	männl.	X		
118629	43	Hd. Mischling	9	weibl. kastr.		X	
120452	44	Foxterrier	3	männl.	X		
122150	45	Boxer	7	männl. kastr.		X	
12048	46	Dachshund	10	männl.		X	
130308	47	Hd. Mischling	5	weibl.			
39708	48	Labrador Retriever	6	weibl.			

#### 4.1.1.1 Bewertung des I396V Polymorphismus im caninen Oatp1b4

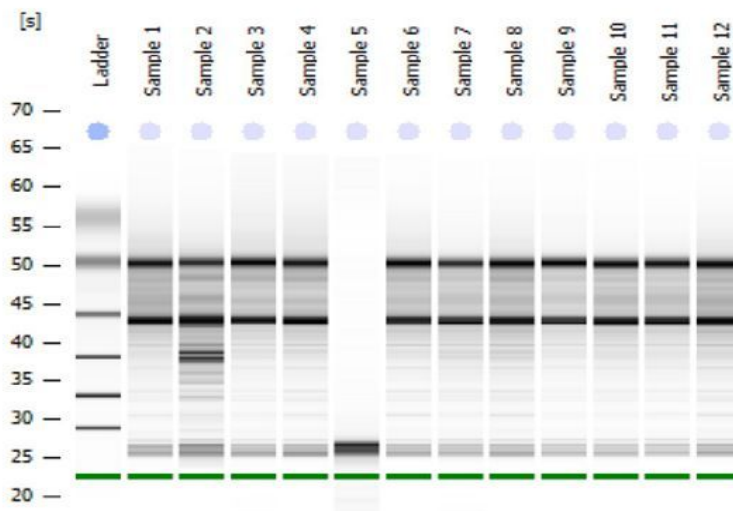
Mit Hilfe des Programms *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) wurde eine bioinformatische Bewertung des SNPs I396V durchgeführt. *PolyPhen-2* greift dabei auf vorhandene Proteindatenbanken zurück und bewertet dabei, wie hoch konserviert eine Aminosäure ist und ob der Aminosäureaustausch eine Disulfid-, Thiolester-, Thiolether-, Fett- oder Metallionenbindungsstelle betrifft oder auch an einer potentiellen Glykosylierungs- oder Phosphorylierungsstelle sitzt. In Verbindung mit der Vorhersage zur strukturellen Erscheinung des Proteins wird eine mögliche funktionelle Auswirkung der Aminosäuresubstitution beurteilt. Hierfür wird der *PHAT transmembrane-specific matrix score* (Ng et al. 2000) verwendet. Für den SNP I396V wurde ein Score von 0,353 berechnet, was für einen wahrscheinlich benignen Polymorphismus spricht. Dennoch wurde der cfOatp1b4\* in der funktionellen Überprüfung unter Verwendung verschiedener Substrate mit dem Wildtyp verglichen, um die potentielle Benignität zu bestätigen bzw. zu widerlegen.

#### 4.1.2 Expressionsunterschiede des caninen Oatp1b4-Transporters in der Leber

Um interindividuelle Unterschiede im Expressionsniveau des Oatp1b4 in der Leber des Hundes zu erfassen, wurde ein spezieller *TaqMan Gene Expression Assay* (Life Technologies; Foster City, CA, USA) für die quantitative *Real-Time PCR* verwendet (Cf02624370\_m1).

#### 4.1.2.1 Überprüfung der RNA-Qualität und -Quantität mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer*

Um eine gute Vergleichbarkeit der Proben in der quantitativen *Real-Time PCR* zu garantieren, ist die Qualität der eingesetzten cDNA von großer Bedeutung. Aus diesem Grund mussten RNA-Proben von schlechter Qualität oder zu geringer Quantität identifiziert und von der cDNA-Synthese ausgeschlossen werden, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden. Die Qualität der RNA-Proben wurde hierfür auf dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* System (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) analysiert (siehe Abb. 4.4). Hierbei wurde der RIN-Wert (*RNA Integrity Number*) genutzt, der Aufschluss über den Grad der Degradierung der RNA liefert (Schröder et al. 2006). Ein hoher RIN-Wert ( $> 8$ ) steht hierbei für eine sehr gute RNA Qualität. Für die nachfolgende cDNA Synthese wurden nur RNA-Proben mit RIN-Werten von  $> 7,3$  verwendet.



**Abb. 4.4: Virtuelles Gelbild von RNA Proben, generiert vom *Agilent 2100 Bioanalyzer***

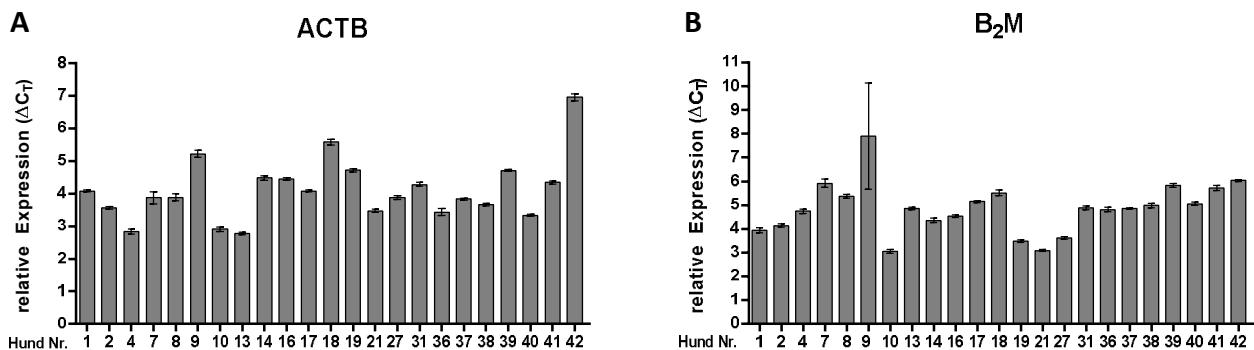
Neben dem *Ladder* wurden 12 RNA-Proben verschiedener Hunde aufgetragen. Bei allen Proben, außer *Sample 5*, sind die ribosomalen 18S- und 28S-Banden deutlich zu sehen. *Sample 2* weist bereits eine beginnende Degradierung der RNA auf, wohingegen bei *Sample 5* eine vollständige Degradierung zu Grunde liegt. Diese beiden RNA-Proben wurden daher nicht in der *Real-Time PCR* eingesetzt. Die RIN-Werte der übrigen 10 RNA Proben lagen zwischen 7,3 und 8,1.

#### 4.1.2.2 *Real-Time PCR* mit B<sub>2</sub>M und ACTB

In der quantitativen *Real-Time PCR* erfolgte dann die Bestimmung der C<sub>T</sub>-Werte in Relation zu den C<sub>T</sub>-Werten der verwendeten Kontrollgene  $\beta$ -Actin (ACTB) und  $\beta_2$ -Mikroglobulin (B<sub>2</sub>M). Diese beiden Kontrollgene wurden ausgewählt, da sie eine relativ konstante Expression in der Hundeleber aufweisen (Peters et al. 2007). In dem Versuchsaufbau wurde jeweils ein dreifacher Ansatz pipettiert und aus dem Durchschnitt der drei ermittelten C<sub>T</sub>-Werte der

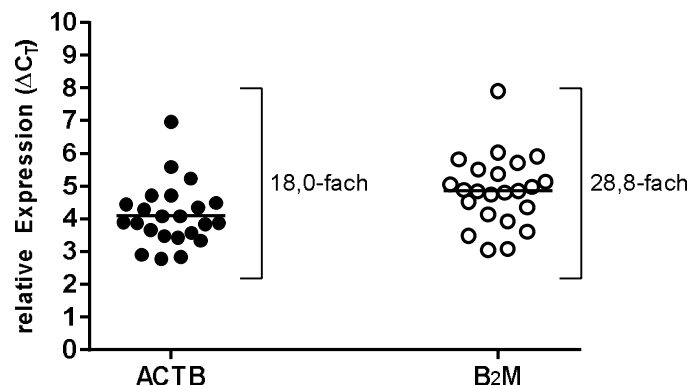
Durchschnitts- $C_T$ -Wert bestimmt. Der  $\Delta C_T$ -Wert wurde anschließend mit folgender Formel berechnet:  $\Delta C_T = C_T \text{ Oatp1b4} - C_T \text{ Kontrollgen}$ .

Da die relative Expression der Hunde untereinander nur im Bereich weniger  $\Delta C_T$ -Werte streute, kann die Expression von Oatp1b4 in der Leber des Hundes als recht stabil angesehen werden (siehe Abb. 4.5 und 4.6). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression des cfOatp1b4 und der Rasse oder dem Geschlecht der Hunde dargestellt werden, ebenso wenig zu den beiden cfOatp1b4-Varianten. Bei Auswertung der Daten war auch zu berücksichtigen, dass das Probenmaterial von kranken Tieren stammte, welche z.T. auch Veränderungen der Leber (z.B. Leberfibrose, Fettleber) aufwiesen.



**Abb. 4.5: Relative Expression des caninen Oatp1b4 in Relation zu den Kontrollgenen  $\beta$ -Actin (A) und  $B_2M$  (B) unter Verwendung des TaqMan Assays Cf02624370\_m1**

Für jede Leberprobe wurde der Durchschnitts- $\Delta C_T$ -Wert bestimmt und zusammen mit dem Standardfehler dargestellt. Hierbei steht ein niedriger  $\Delta C_T$ -Wert für eine hohe Expressionsrate des cfOatp1b4.



**Abb. 4.6: Dot-Blot-Darstellung der  $\Delta C_T$ -Werte des caninen Oatp1b4 in Relation zu den Kontrollgenen  $\beta$ -Actin und  $B_2M$**

Diese Darstellung verdeutlicht, dass die Expression des cfOatp1b4 in der Leber sich in der untersuchten Hundepopulation kaum unterscheidet. Der Großteil der Proben lag im Bereich des Mittelwertes (für  $\beta$ -Aktin bei einem  $\Delta C_T$ -Wert von 4,1 und für  $B_2M$  bei 4,9). Einige Proben wichen jedoch stärker ab, sodass der Unterschied zwischen dem Hund mit der höchsten Expression des Oatp1b4 und dem Hund mit der niedrigsten Expression das 18,0-fache für  $\beta$ -Actin und das 29-fache für  $B_2M$  betrug.



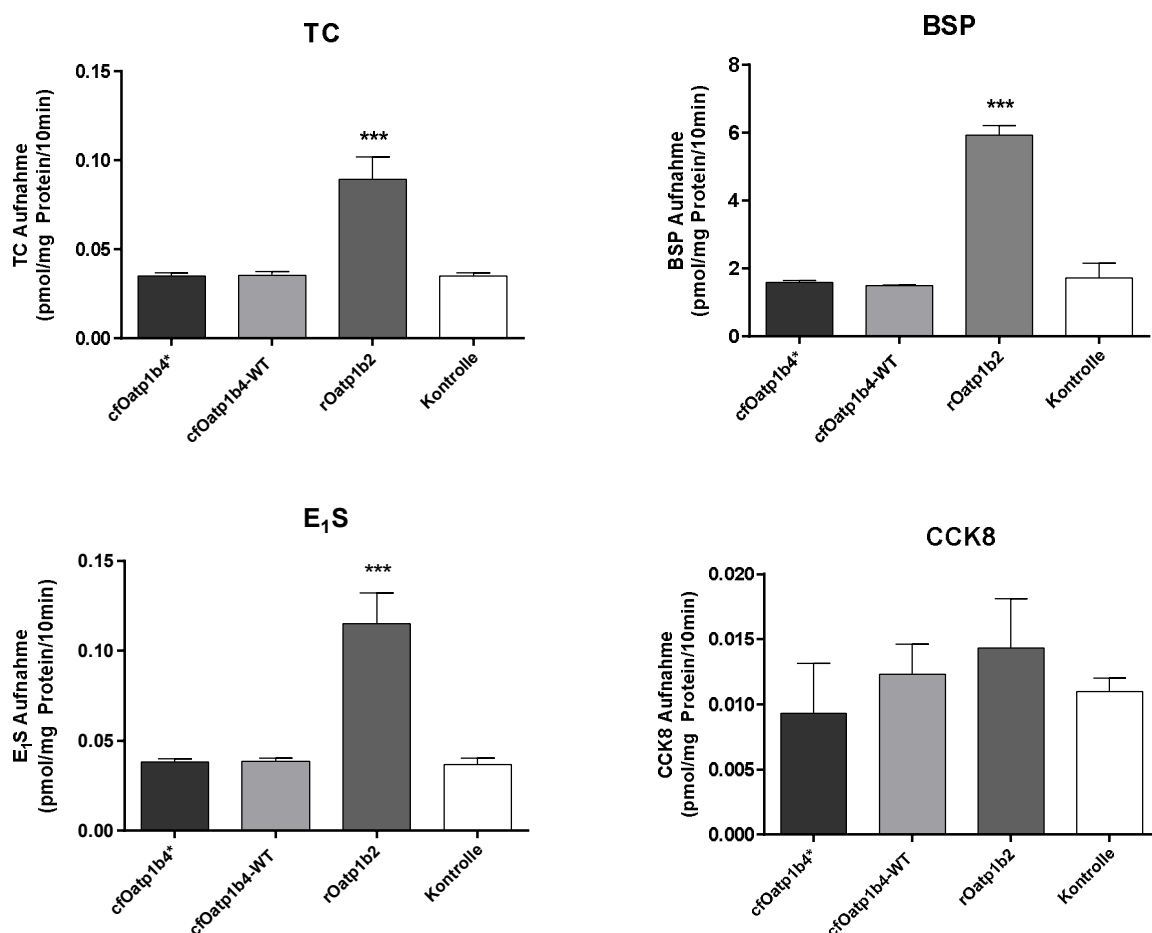
### 4.1.3 Funktionelle Charakterisierung des caninen Oatp1b4 im Zellkulturmodell

Die beiden cfOatp1b4-Varianten wurden in den *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* Vektor kloniert, wobei das Stopcodon belassen wurde, um einen möglichen Einfluss des His-tags ausschließen zu können. Die jeweiligen cfOatp1b4-Plasmide wurden transient in verschiedene Zelllinien transfiziert und die Transportmessungen 48 h nach Transfektion durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde in allen experimentellen Studien der Oatp1b2 der Ratte mitgeführt und genauso verfahren, wie mit den cfOatp1b4-Varianten. Als Negativkontrolle wurden mit Leervektor transfizierte Zellen verwendet.

#### 4.1.3.1 Transient transfizierte GripTite 293 MSR-Zellen

Zunächst wurden GripTite 293 MSR-Zellen transient transfiziert und ein 10-minütiger Aufnahmeversuch mit Taurocholat ( $[^3\text{H}]\text{TC}$ ), Bromosulfophthalein ( $[^3\text{H}]\text{BSP}$ ), Estron-3-sulfat ( $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ ) und Cholestykinin 8 ( $[^3\text{H}]\text{CCK8}$ ) durchgeführt. Die Substanzen wurden mit Tritium markiert, um über eine Flüssigkeitsszintillationsmessung die Radioaktivität und somit die Aufnahme der Substanzen detektieren zu können. Als Testsubstanzen wurden bekannte Substrate der verwandten humanen OATPs gewählt. Es wurden mehrere Experimente durchgeführt, sowohl mit Substratkonzentrationen im niedrigen Bereich, als auch mit einer Standardkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  der Substrate.

Eine signifikante Aufnahme von TC, BSP und  $\text{E}_1\text{S}$  konnte lediglich für Oatp1b2 der Ratte gezeigt werden, wohingegen die beiden caninen Oatp1b4-Varianten keine Aufnahme der drei Substanzen zeigten. Für CCK8 wies keiner der vorliegenden Oatp1b-Transporter eine deutliche Aufnahmeleistung auf.

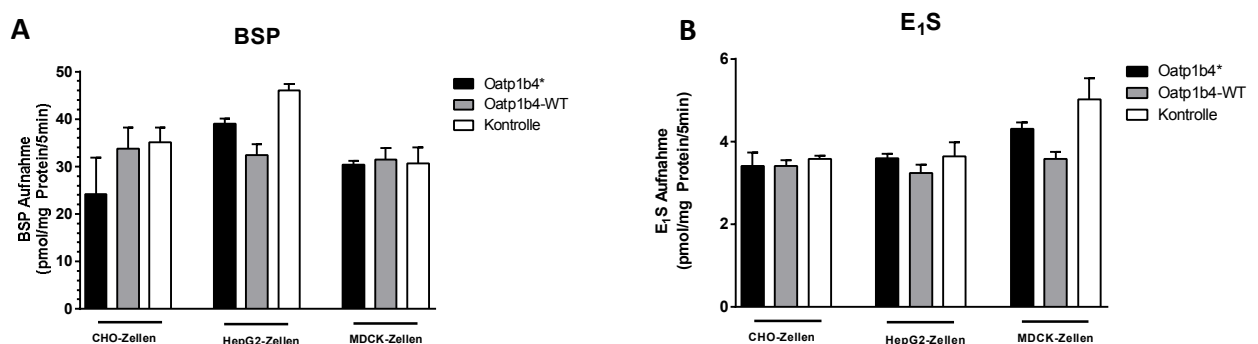


**Abb. 4.7: Aufnahmestudien in transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen**

Für diese Aufnahmestudien wurden [ $^3\text{H}$ ]BSP (28 nM), [ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S (7 nM), [ $^3\text{H}$ ]TC (8 nM) und [ $^3\text{H}$ ]CCK8 (4,3 nM) verwendet. Die Aufnahme der Substanzen wurde über 10 min bei 37°C gemessen und die aufgenommene Radioaktivität nach Messung im Flüssigkeitsszintillationscounter mit der Proteinmenge der lysierten Zellen korreliert. Es wurden die Oatp1b-Varianten von Hund (cfOatp1b4-WT und cfOatp1b4\*) und Ratte (rOatp1b2) eingesetzt, als Kontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen. Dargestellt sind jeweils die MW  $\pm$  SD eines repräsentativen Experiments mit n=4 Bestimmungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *One way ANOVA*. \*\*\*Signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit  $p < 0,001$ .

#### 4.1.3.2 Transient transfizierte CHO-, MDCK-, HepG2-Zellen

Da für die beiden caninen Oatp1b4-Varianten kein signifikanter Transport in den GripTite 293 MSR-Zellen zu detektieren war, wurden für weitere Aufnahmeversuche CHO-, MDCK- und HepG2-Zellen verwendet. Auch hier wurde eine transiente Transfektion mit den beiden caninen Oatp1b4-Varianten durchgeführt und nach 48 h Inkubationszeit die Aufnahme von BSP und E<sub>1</sub>S nach 5 min gemessen. Jedoch ließ sich auch hier keine signifikante Aufnahme der beiden Substrate zeigen.

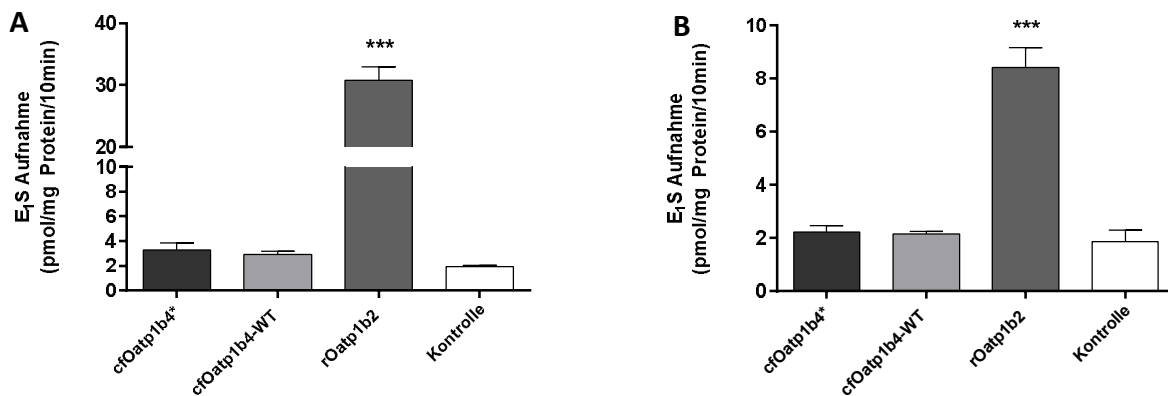


**Abb. 4.8: Aufnahmestudien in transient transfizierten CHO-Zellen, HepG2-Zellen und MDCK-Zellen**

Für diese Aufnahmestudien wurde [<sup>3</sup>H]BSP (1 μM) und [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S (1 μM) verwendet. Die Aufnahme der Substanzen wurde über 5 min bei 37°C gemessen und die aufgenommene Radioaktivität nach Messung im Flüssigkeitsszintillationscounter mit der Proteinmenge der lysierten Zellen korreliert. Es wurden beide Oatp1b4-Varianten eingesetzt. Als Kontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen. Dargestellt sind jeweils die MW ± SD aus einem Experiment mit n=3 Bestimmungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *One way ANOVA*. Es wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt.

#### 4.1.3.3 Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien

Um die Expressionsrate der transient transfizierten cfOatp1b4-Varianten zu verbessern, wurde in weiteren Versuchen neben dem *Lipofectamine 2000* (Life Technologies) als Transfektionsreagenz auch das *FuGENE HD Transfection Reagent* (Promega) verwendet. Hierbei zeigte sich nach transients Transfektion mit *FuGENE HD Transfection Reagent* eine geringere Transportleistung der Oatp1b-Transkripte. Somit wurde im weiteren Verlauf der Arbeit mit dem *Lipofectamine 2000* gearbeitet.



**Abb. 4.9: Aufnahmestudien in transient transfizierte GripTite MSR-Zellen unter Verwendung von Lipofectamine 2000 und FuGENE HD als Transfektionsreagenz**

Die GripTite MSR-Zellen wurden mit den Oatp1b-Plasmiden von Hund (cfOatp1b4-WT und cfOatp1b4\*) und Ratte (rOatp1b2) transient transfiziert. Hierfür wurde *Lipofectamine 2000* (A) und *FuGENE HD Transfection Reagent* (B) als Transfektionsreagenzien verwendet.

Für diese Aufnahmestudien wurde [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt. Die Aufnahme der Substanz wurde über 10 min bei 37°C gemessen und die aufgenommene Radioaktivität nach Messung im Flüssigkeitsszintillationscounter mit der Proteinmenge der lysierten Zellen korreliert. Als Kontrolle dienen mit Leervektor transfizierte Zellen. Dargestellt sind jeweils die MW ± SD eines Experimentes mit n=4 Bestimmungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *One way ANOVA*. \*\*\*Signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit *p*<0,001.

#### 4.1.4 Etablierung der stabil transfizierten cfOatp1b4-WT-, cfOatp1b4\*- und rOatp1b2-Zelllinien

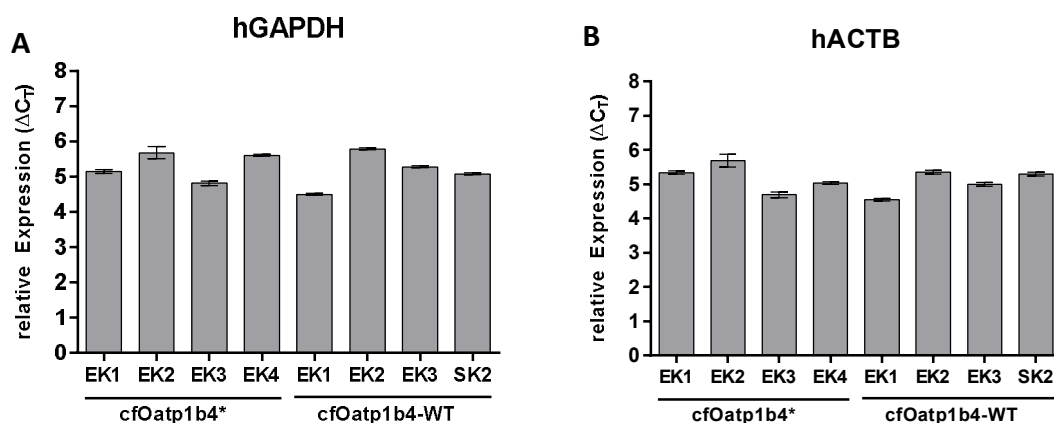
Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse bei der transienten Transfektion wurde eine stabile Transfektion der caninen Oatp1b4-Varianten in FlpIn-HEK293-Zellen durchgeführt, um die Variable der schwankenden Transfektionseffizienz auszuschalten. Hierfür wurde der offene Leserahmen (*open reading frame*, orf) des cfOatp1b4-Wildtyps und des polymorphen cfOatp1b4\* dauerhaft in das Genom der Zielzellen (FlpIn-HEK293-Zellen) integriert. Um eine Positivkontrolle zur Verfügung zu haben, wurde der Oatp1b2 der Ratte ebenfalls stabil in FlpIn-HEK293-Zellen transfiziert, da dieser bei der transienten Transfektion eine reproduzierbare und signifikante Transportleistung erbrachte.

##### 4.1.4.1 Überprüfung der stabilen Zelllinien mittels quantitativer *Real-Time PCR*

Zu Beginn der stabilen Transfektion wurde jedes Insert im vierfachen Ansatz kultiviert und von jedem dieser Ansätze ein Einzelklon und ein Sammelklon zur weiteren Kultivierung entnommen. Durch den Einsatz eines Selektionsantibiotikums (Hygromycin B) während der Kultivierung sterben nicht-transfizierte Zellen durch das Fehlen des entsprechenden Resistenzmarkers ab. Im weiteren Verlauf wurde von den Zellen RNA isoliert und mittels

*Real-Time PCR* die Expression des cfOatp1b4 in den Zellen ermittelt. Als Kontrollgene wurden die humanen Gene GAPDH und ACTB verwendet, welche eine konstante Expression in HEK293-Zellen aufweisen.

Es zeigten sich generell nur geringe Unterschiede in der Expression der einzelnen Zellklone, sodass im Anschluss eine funktionelle Überprüfung aller aufgeführten Klone erfolgte.



**Abb. 4.10: Relative Expression der mit cfOatp1b4\* und cfOatp1b4-WT stabil transfizierten FlpIn-HEK293-Zellen in Relation zu den Kontrollgenen hGAPDH (A) und hACTB (B)**

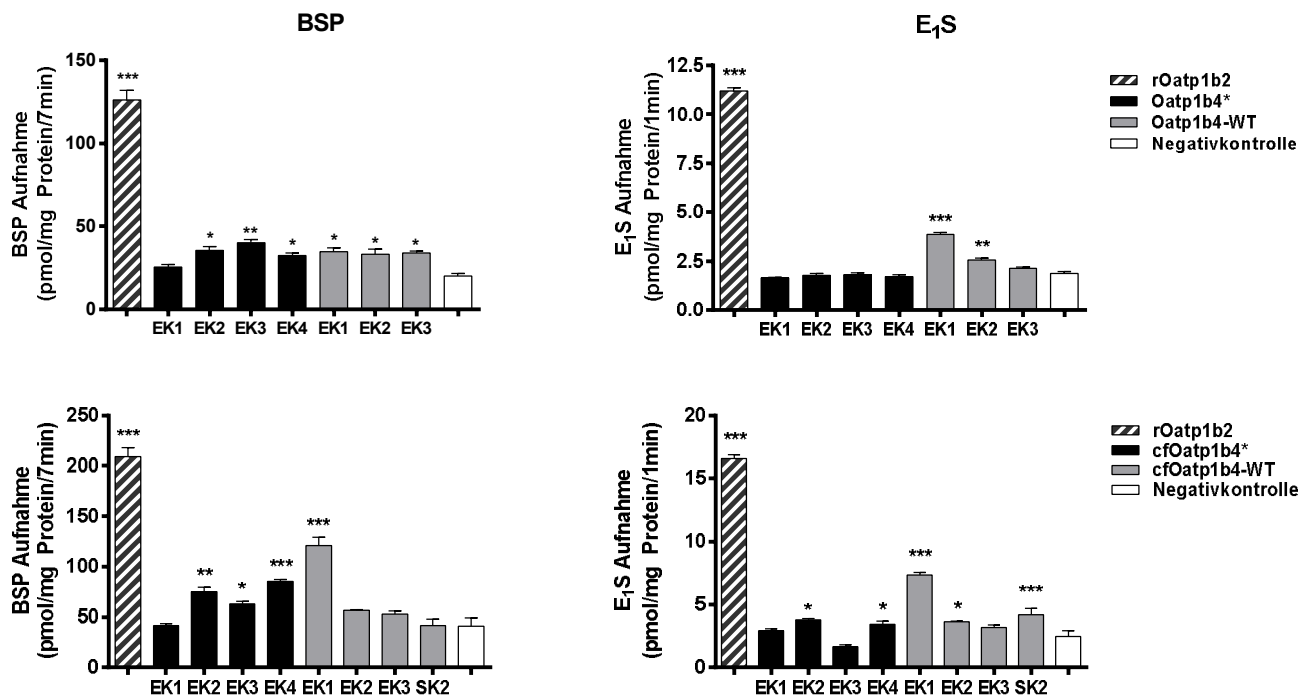
Die relative Expression der Zielgene in den stabil transfizierten FlpIn-HEK293-Zellen wurde mittels quantitativer Real-Time PCR Analyse ermittelt. Unter Verwendung des TaqMan Assays Cf02624370\_m1 wurde für jeden Zellklon aus n=3 der Durchschnitts- $\Delta C_T$ -Wert bestimmt. Hierbei steht ein niedriger  $\Delta C_T$ -Wert für eine hohe Expressionsrate des Oatp1b4 in den stabil transfizierten Zellen. (EK=Einzelklon; SK=Sammelklon)

## 4.1.5 Funktionelle Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien

### 4.1.5.1 Funktionelle Überprüfung der verschiedenen Oatp-Zellklone

Da die Expression des cfOatp1b4\* bzw. cfOatp1b4-WT sich in der *Real-Time PCR* als relativ konstant in den verschiedenen Zellklonen darstellte, wurden alle generierten Klone funktionell überprüft.

Angelehnt an Studien mit den humanen OATP1B1 und OATP1B3 wurde zunächst die Aufnahme von 0,5  $\mu$ M [ $^3$ H]BSP über 7 min und 1  $\mu$ M [ $^3$ H]E<sub>1</sub>S über 1 min gemessen. Bei mehreren, voneinander unabhängigen Experimenten wurde deutlich, dass alle Zellklone der caninen Oatp1b4-Varianten im Gegensatz zu dem Oatp1b2 der Ratte eine inkonstante und wenn, nur geringe Aufnahme von BSP und E<sub>1</sub>S zeigten.



**Abb. 4.11: Zwei unabhängige Transportstudien der stabil transfizierten Oatp1b-HEK293-Zelllinien**

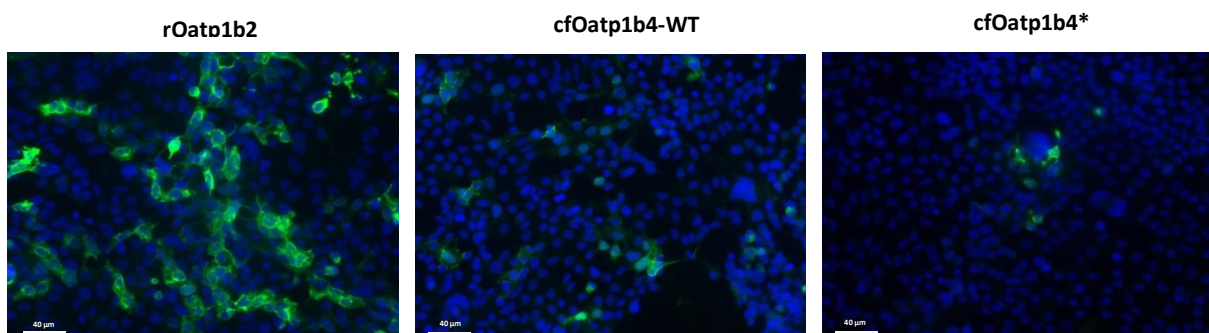
Für diese Aufnahmestudien wurden [ $^3\text{H}$ ]BSP (0,5  $\mu\text{M}$ ) und [ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S (1  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Die Aufnahme der Substanzen wurde über 7 min (BSP) bzw. 1 min (E<sub>1</sub>S) bei 37°C gemessen. Durch 3-maliges Waschen mit eiskaltem PBS wurde die Aufnahme der Substanzen gestoppt und die aufgenommene Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationscounter aus dem Zelllysate bestimmt und mit der Proteinmenge korreliert. Es wurden die in der *Real-Time PCR* verwendeten Zellklone der cfOatp1b4-Varianten überprüft (cfOatp1b4-WT = Referenz; cfOatp1b4\* = 693 A>G u. 1186 A>G). Als Positivkontrolle fungierte der Oatp1b2-Transporter der Ratte. Als Negativkontrolle dienten FlpIn-HEK293-Zellen ohne *gene of interest*. Dargestellt sind jeweils die MW  $\pm$  SD eines Experimentes mit n=4 Bestimmungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *One way ANOVA*. \*Signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  und \*\*\* $p<0,001$ .

#### 4.1.6 Nachweis des caninen Oatp1b4-Proteins

Um eine mögliche Ursache für die schlechte Transportleistung des cfOatp1b4 im Zellsystem zu finden, wurde mittels Immunfluoreszenz die Transfektionsrate und die Lokalisation der Proteine überprüft. Zusätzlich diente die *Western Blot* Analyse zum generellen Proteinnachweis. Hierfür wurde bei den bereits für die Transportexperimente verwendeten Plasmiden eine zielgerichtete Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.7) durchgeführt, bei welcher das Stopcodon aus den Plasmiden entfernt wurde, sodass der V5-tag des Vektors *in frame* abgelesen werden konnte. Mit einem kommerziell erhältlichen, gegen das V5-tag gerichteten Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe) wurde im Anschluss sowohl die Immunfluoreszenzmikroskopie als auch der Western Blot an transient transfizierten Zellen durchgeführt.

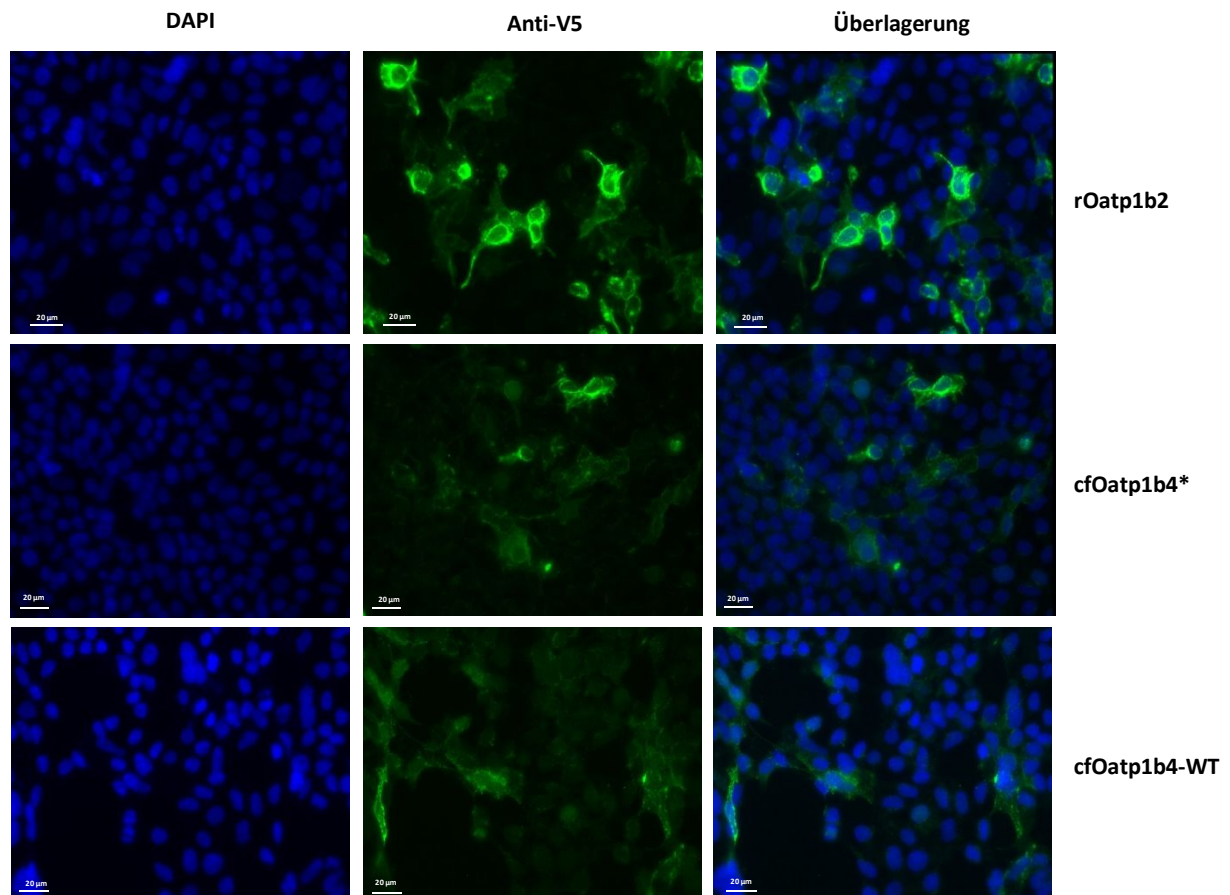
#### 4.1.6.1 Indirekte Immunfluoreszenz im Zellkulturmodell

Der Nachweis der V5-His markierten Proteine erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Hierbei wurde der *Maus anti-V5 Antikörper* (Invitrogen) mit dem fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper *Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelten anti-Maus* (Invitrogen) nachgewiesen und somit eine Detektion des entsprechenden Oatp1b-Proteins ermöglicht. Es wurden zunächst transient transfizierten Griptite 293 MSR-Zellen verwendet. Hierbei konnte für das Oatp1b2-Protein der Ratte ein deutliches Signal detektiert werden, welches überwiegend in der Zellmembran lokalisiert war. Das Fluoreszenzsignal der cfOatp1b4-Proteine hingegen fiel deutlich schwächer aus. Dieses Ergebnis kann auf eine unzureichende Transfektionsrate der cfOatp1b4-Vektoren oder eine verminderte Translation oder Stabilität der Oatp1b4-Proteine hinweisen.



**Abb. 4.12: Immunfluoreszenz der mit cfOatp1b4-WT, cfOatp1b4\* und rOatp1b2 transient transfizierten Griptite 293 MSR-Zellen**

Für die Immunfluoreszenz wurden HEK293-Zellen auf Deckgläschen in 24-Well-Schalen kultiviert und die beiden cfOatp1b4-Varianten als auch rOatp1b2 transient transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Immunfärbung. Hierbei wurde der *Maus anti-V5 Antikörper* (1:5.000) als Primär- und der *Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelte anti-Maus* (1:800, grün) als Sekundärantikörper verwendet. Mit beiden Antikörpern wurden die Zellen jeweils für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellkernfärbung mit DAPI (1:5.000, blau). Dargestellt ist eine Übersichtsaufnahme in 40-facher Vergrößerung.

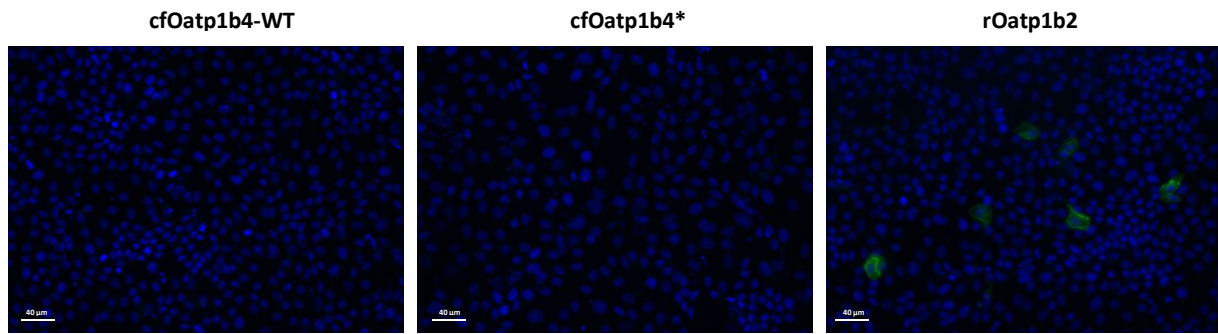


**Abb. 4.13: Immunfluoreszenz der mit cfOatp1b4-WT, cfOatp1b4\* und rOatp1b2 transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen in 40-fache Vergrößerung**

Je 48 h nach der transienten Transfektion erfolgte die Immunfärbung mit dem *Maus anti-V5 Antikörper* (1:5.000) als Primär- und dem *Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelter anti-Maus* (1:800, grün) als Sekundärantikörper. Mit beiden Antikörpern wurden die Zellen jeweils für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellkernfärbung mit DAPI (1:5.000, blau). Hier dargestellt ist die Maximalprojektion eines Z-Stapels in der 40-fachen Vergrößerung.

Um das zwischen Spezies auftretende, unterschiedliche *codon usage* (siehe Kapitel 5.2.3) als Grund für die geringe Proteinexpression der Oatp1b4-Proteine in den HEK293-Zellen auszuschließen wurde zusätzlich auch eine Immunfluoreszenz in MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) Zellen durchgeführt. Dabei zeigte der rOatp1b2 nur sehr vereinzelt ein Fluoreszenzsignal, wohingegen bei den cfOatp1b4-Varianten keinerlei Signal detektierbar war.



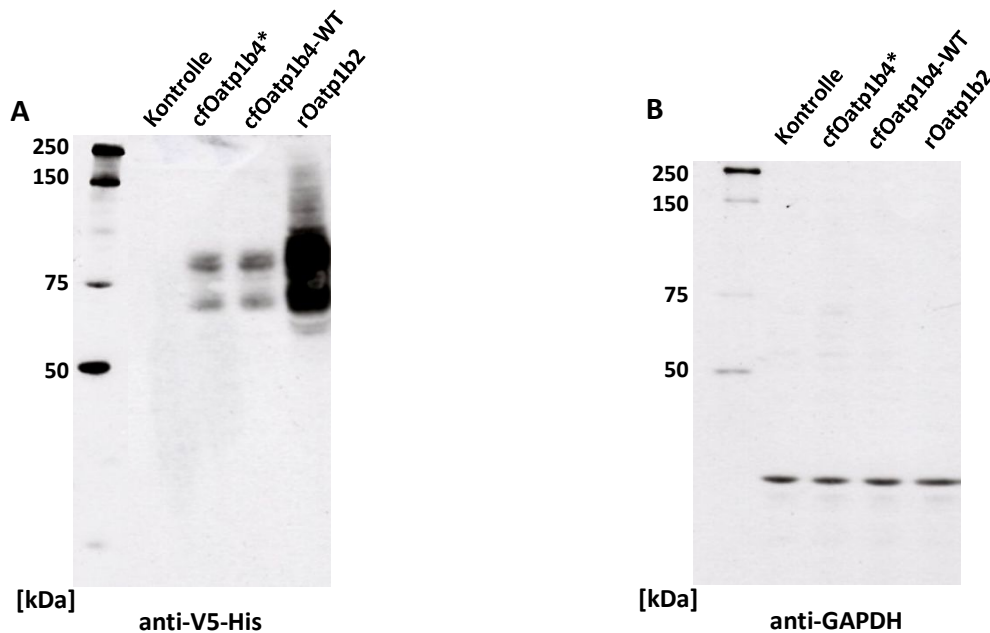


**Abb. 4.14: Immunfluoreszenz der mit den Oatp1b-Varianten von Ratte und Hund transient transfizierten MDCK-Zellen**

Die MDCK-Zellen wurden auf Deckgläschen in 24-Well-Schalen kultiviert und mit den Expressionsvektoren der Oatp1b-Varianten von Ratte und Hund transient transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Immunfärbung, wobei jeweils 1h mit dem *Maus anti-V5 Antikörper* (1:5.000) als Primär- und dem *Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelte anti-Maus* (1:800, grün) als Sekundärintikörper inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Zellkernfärbung mit DAPI (1:5.000, blau). Dargestellt ist eine Übersichtsaufnahme in 40-facher Vergrößerung.

#### 4.1.6.2 Western Blot Analyse

Für die *Western Blot* Analyse wurden ebenfalls die V5-His markierten Proteine verwendet. Diese wurden aus transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen mit RIPA-Puffer extrahiert, auf einem 10 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet, bevor die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte. Es konnten sowohl bei den cfOatp1b4-Varianten, als auch bei rOatp1b2 zwei Banden visualisiert werden, die jeweils Molekulargewichte von ~85 kDa und ~73 kDa aufwiesen. Die 85 kDa Banden stimmen mit Angaben zu Oatp1b4 des Hundes und Oatp1b2 der Ratte überein (Cattori et al. 2001; Gui und Hagenbuch 2010). Die 73 kDa Banden weisen auf posttranslational modifizierte Proteine hin, welche durch Glykosylierung entstanden sein könnten. Bei der Ratte scheint erheblich mehr Gesamtprotein des Zielproteins detektierbar zu sein im Vergleich zu den cfOatp1b4-Varianten, zumal mit dem Kontrollgen GAPDH für alle Proben ein gleichmäßiger Proteinauftrag dargestellt werden konnte. Dieses Bild stimmt mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz und der funktionellen Transportexperimente überein.



**Abb. 4.15: Western Blot Analyse der mit cfOatp1b4-WT, cfOatp1b4\* und rOatp1b2 transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zelllinien**

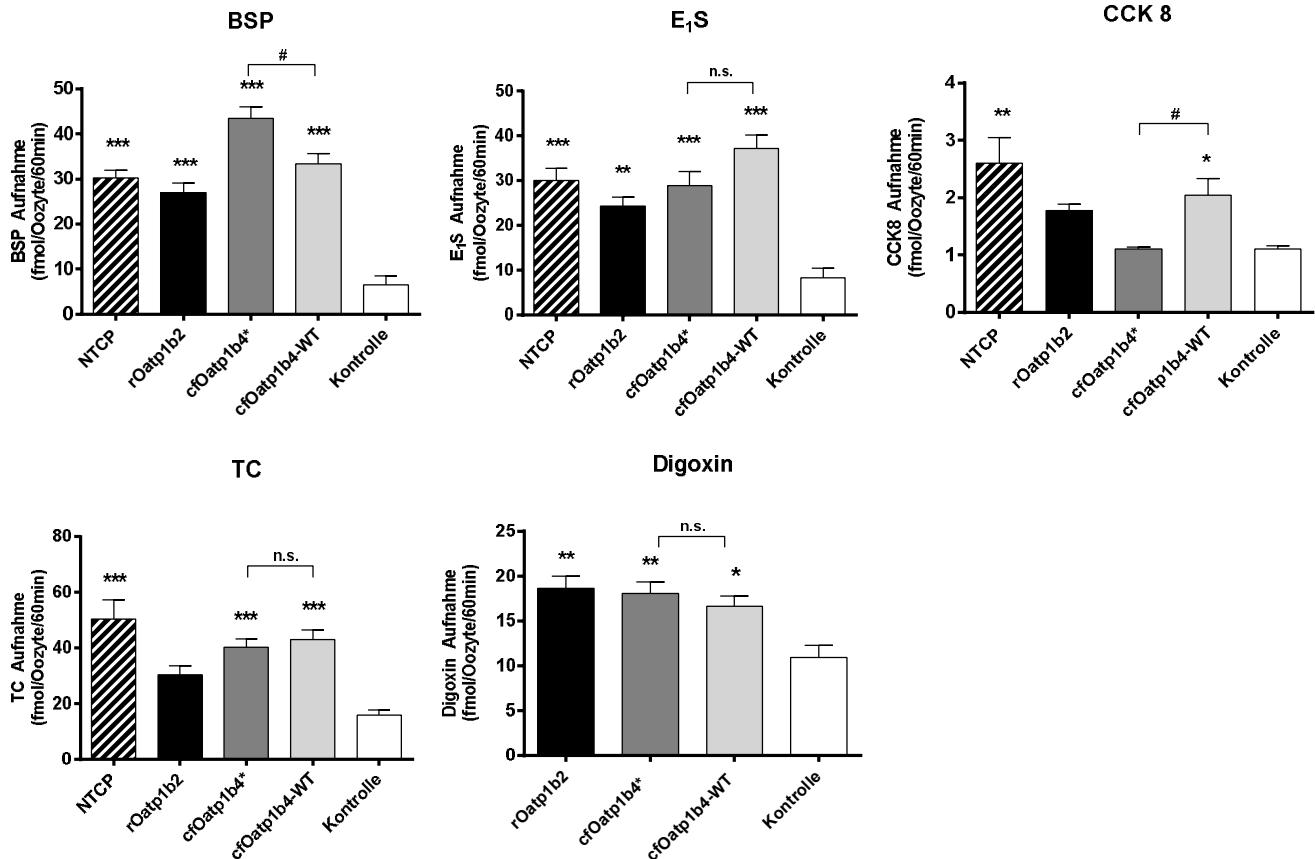
GripTite 293 MSR-Zellen wurden mit den Oatp1b-Vektoren von Hund (cfOatp1b4-WT und cfOatp1b4\*) und Ratte (rOatp1b2) transient transfiziert. Als Kontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen. Die Proteinexpression der Oatp1b-Varianten wurde mittels des *Maus anti-V5-Antikörpers* (1:5.000) dargestellt (A). Als Kontrolle des Proteinauftrags wurde bei allen Proben GAPDH mittels anti-human GAPDH Antikörper (1:25.000) nachgewiesen (B). Die Belichtungszeit betrug jeweils 2 min.

#### 4.1.7 Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

Als weiteres Expressionsmodell für den caninen Oatp1b4 wurden *Xenopus laevis* Oozyten verwendet, welche mit jeweils 4,6 ng cRNA der beiden Oatp1b4-Varianten injiziert und nach dreitägiger Expressionszeit in entsprechenden Transportexperimenten überprüft wurden. Als Positivkontrolle wurden die Transporter Oatp1b2 der Ratte und der humane NTCP (*Na<sup>+</sup>/Taurocholate Co-transporting Polypeptide*) verwendet. Als Negativkontrolle dienten mit H<sub>2</sub>O injizierte *X. laevis* Oozyten.

##### 4.1.7.1 Substratscreening

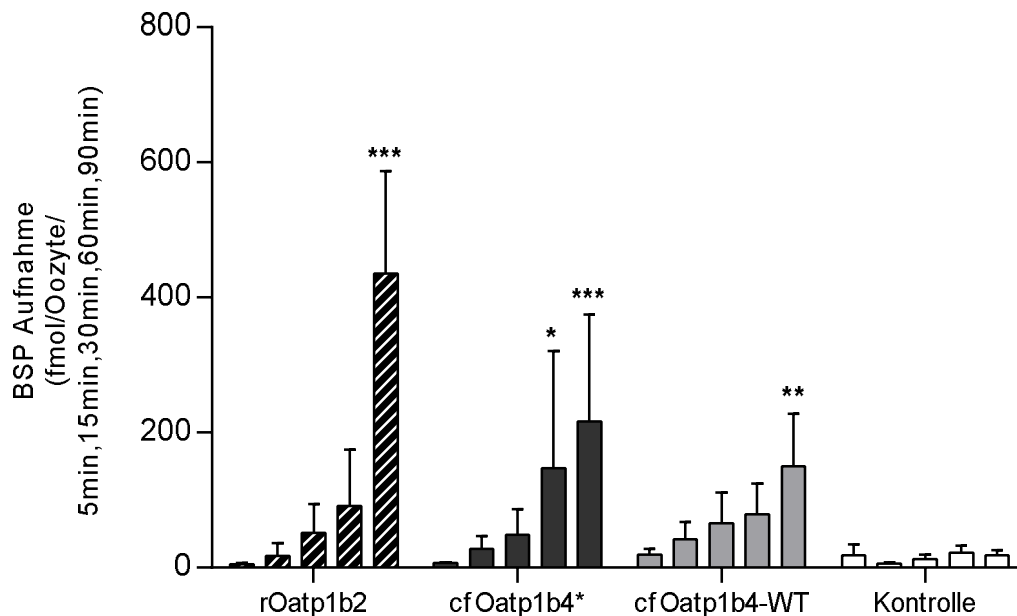
Hierbei wurde ein 60-minütiger Aufnahmeversuch mit radioaktiv markiertem BSP, E<sub>1</sub>S, TC, CCK8 und Digoxin durchgeführt. Wie in Abbildung 4.16 zu sehen ist, konnte für beide cfOatp1b4-Varianten ein signifikanter Transport von BSP, E<sub>1</sub>S, TC und Digoxin nachgewiesen werden. Eine Aufnahme von CCK8 zeigte lediglich der cfOatp1b4-WT, nicht jedoch die polymorphe Variante. Interessanterweise zeigt die polymorphe Variante aber eine signifikant höhere BSP-Aufnahme als die der WT-Variante.



**Abb. 4.16: Transportstudien mit radioaktiv-markiertem E<sub>1</sub>S, BSP, CCK8, TC und Digoxin in *Xenopus laevis* Oozyten.**

Die Oozyten wurden jeweils mit 4,6 ng cRNA der beiden caninen Oatp1b4-Varianten (cfOatp1b4-WT = Referenz; cfOatp1b4\* = 693 A>G u. 1186 A>G), Oatp1b2 der Ratte, humanem NTCP (*Na<sup>+</sup>/Taurocholate Co-transporting Polypeptide*) und H<sub>2</sub>O injiziert. Oatp1b2 der Ratte und NTCP fungierten hierbei als Positivkontrolle und die mit H<sub>2</sub>O injizierten Oozyten dienten als Negativkontrolle. Nach dreitägiger Expressionszeit erfolgte eine 60-minütige Transportmessung. Anschließend wurden die Oozyten in eiskaltem Puffer gewaschen, vereinzelt und die aufgenommene Radioaktivität einer jeden Oozyte im Flüssigkeitsszintillationscounter aus dem Lysat dieser gemessen. Dargestellt sind die MW ± SD von 8-20 Oozyten eines repräsentativen Experiments. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *One way ANOVA*. \*Signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit \**p*<0,05, \*\**p*<0,01 und \*\*\**p*<0,001. # signifikant mit *p*<0,05. n.s. = nicht signifikant

Um die Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit zu untersuchen wurde [<sup>3</sup>H]BSP verwendet, da dieses über 60 min eine deutliche Aufnahme für beide cfOatp1b4-Varianten zeigte und ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden zu erkennen war. Die Messpunkte wurden bei 5 min, 15 min, 30 min, 60 min und 90 min gewählt. Abbildung 4.17 zeigt bereits ab 15 min einen Anstieg der BSP-Aufnahme im Vergleich zu den Kontroll-Oozyten. Eine Signifikanz konnte für das vorliegende Experiment bei rOatp1b2 und cfOatp1b4-WT jedoch erst ab 90 min, für cfOatp1b4\* ab 60 min verzeichnet werden.



**Abb. 4.17: Aufnahme von [<sup>3</sup>H]BSP in *X. laevis* Oozyten in Abhängigkeit von der Zeit**

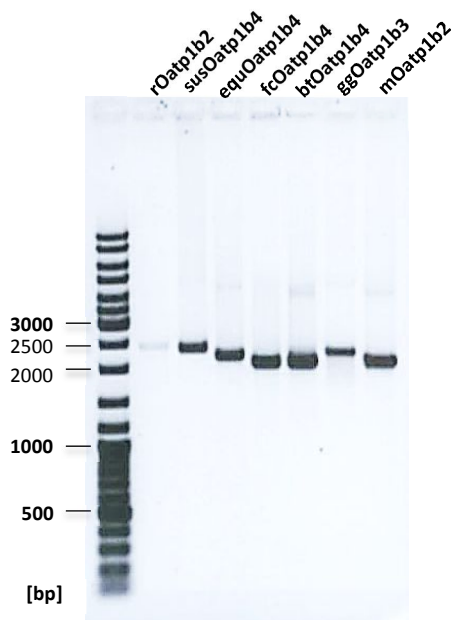
Die Oozyten wurden jeweils mit 4,6 ng cRNA der beiden caninen Oatp1b4-Varianten (cfOatp1b4-WT = Referenz; cfOatp1b4\* = 693 A>G u. 1186 A>G), Oatp1b2 der Ratte und H<sub>2</sub>O injiziert. Nach dreitägiger Expressionszeit erfolgte die Transportmessung. Die Dauer der Aufnahme wurde für 5 min, 15 min, 30 min, 60 min und 90 min festgelegt. Anschließend wurden die Oozyten in eiskaltem Puffer gewaschen, vereinzelt und die aufgenommene Radioaktivität einer jeden Oozyte im Flüssigkeitsszintillationscounter aus dem Lysat dieser gemessen. Dargestellt sind die MW ± SD von 8-20 Oozyten eines repräsentativen Experiments. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Two way ANOVA*. \*Signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit derselben Aufnahmedauer mit \**p*<0,05, \*\**p*<0,01 und \*\*\**p*<0,001.

## 4.2 Die Oatp1b-Subfamilie anderer Tierarten

### 4.2.1 Sequenzanalyse der Oatp1b-Subfamilie bei verschiedenen Tierarten

Auch von Katze, Pferd, Schwein und Ratte wurden *full-length* Amplifikate der Oatp1b-Subfamilie mittels RT-PCR generiert. Die ca. 2200-2500 bp großen Banden wurden ausgeschnitten, die DNA isoliert und diese einer Sequenzanalyse unterzogen. Der rOatp1b2 zeigte sich hierbei identisch zu der bei GenBank mit der *Accession No.* NM\_031650.3 hinterlegten Sequenz. Von Katze, Pferd und Schwein waren bisher nur die von Genomprojekten abgeleiteten Oatp1b4-Sequenzen bekannt. Nach erfolgter Klonierung der *full-length* Amplifikate wurden jeweils drei unabhängige Klone sequenziert und die Sequenzen unter den *Accession Nos.* LN833580.1 (Katze), LN833581.1 (Pferd) und LN833582.1 (Schwein) eingetragen. Der Oatp1b4 Transporters des Rindes lag bereits als Plasmid vor (Döring, 2003) und wurde lediglich in den *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* Vektor subkloniert. Auch für Oatp1b3 des Huhns und Oatp1b2 der Maus wurden *full-length*

Amplifikate generiert. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte trotz vieler Versuche jedoch keine erfolgreiche Klonierung verzeichnet werden, sodass im Folgenden keine weiteren Daten zu Huhn und Maus aufgeführt sind.



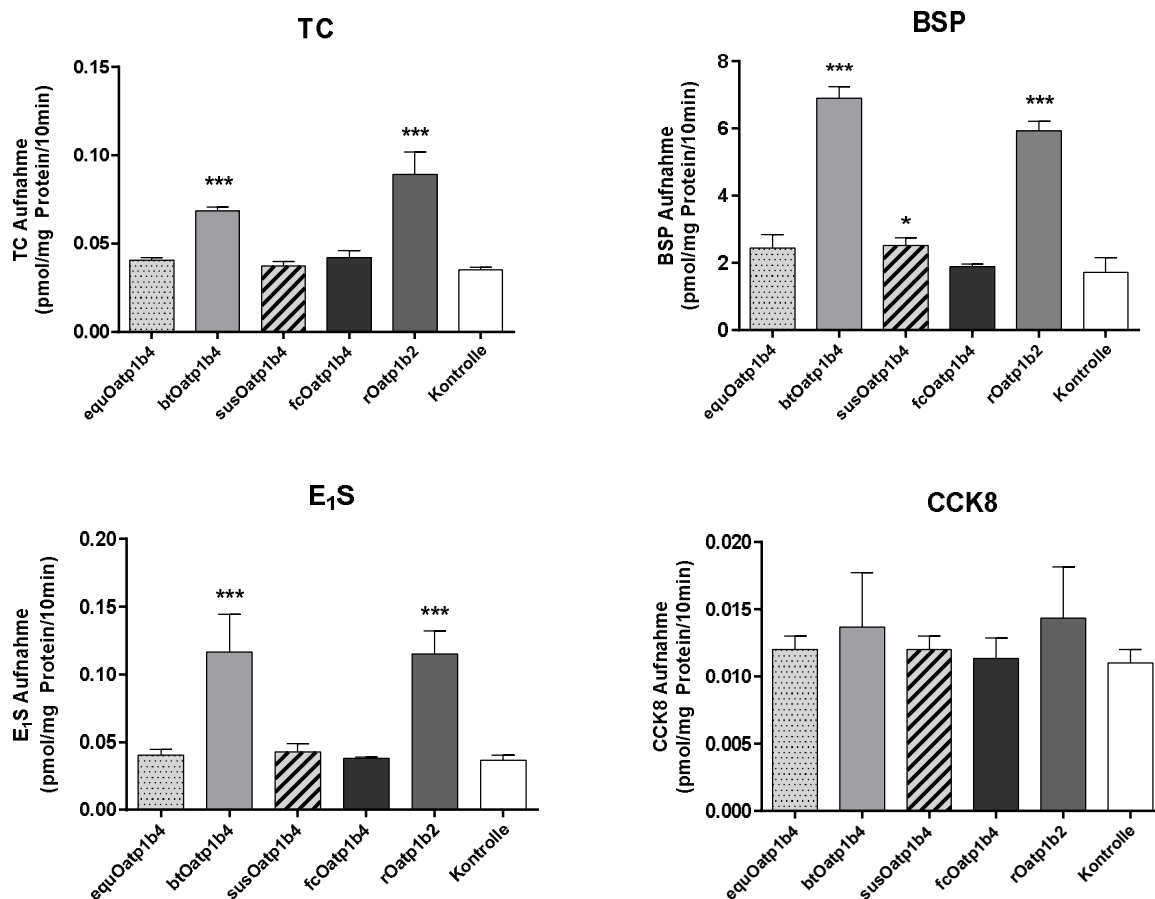
**Abb. 4.18:** Darstellung von PCR-Produkten der Oatp1b-Varianten von Ratte, Schwein, Pferd, Katze, Rind, Huhn und Maus mittels Agarosegelelektrophorese.

Es wurde jeweils 5 µl der Probe und 2 µl Ladepuffer (*Gene Ruler DNA Ladder Mix*; Thermo Scientific, Waltham, USA) auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Es erfolgte die Anfärbung der DNA mit *GelRed* (Biotium, Hayward, CA, USA) und die Visualisierung der PCR-Produkte unter UV-Licht.

#### 4.2.2 Funktionelle Charakterisierung der Oatp1b-Transporter verschiedener Tierarten

Die Oatp1b-Varianten der verschiedenen Tierarten wurden in den *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* Vektor kloniert, wobei das Stopcodon belassen wurde, um einen möglichen Einfluss des *tags* auf Expression, Sorting oder Transport ausschließen zu können. Die jeweiligen Oatp1b-Vektoren wurden transient transfiziert und nach 48 h Aufnahmeversuche über 10 min mit [<sup>3</sup>H]BSP, [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S, [<sup>3</sup>H]TC und [<sup>3</sup>H]CCK8 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden mit Leervektor transfizierte Zellen verwendet.

Eine signifikante Aufnahme von TC, BSP und E<sub>1</sub>S konnte für den Oatp1b4 des Rindes und den Oatp1b2 der Ratte gezeigt werden. Die Oatp1b4-Transporter der anderen Tierarten hingegen zeigten kaum eine Aufnahme der Substanzen. Für CCK8 wies keiner der vorliegenden Oatp1b-Transporter eine gute Aufnahmeleistung auf.



**Abb. 4.19: Transportexperimente mit rOatp1b2, btOatp1b4, susOatp1b4, equOatp1b4 und fcOatp1b4 in transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen**

Für diese Aufnahmestudien wurden [ $^3$ H]BSP (28 nM), [ $^3$ H]E<sub>1</sub>S (7 nM), [ $^3$ H]TC (8 nM) und [ $^3$ H]CCK8 (4,3 nM) verwendet. Die Aufnahme der Substanzen wurde über 10 min bei 37°C gemessen und die aufgenommene Radioaktivität nach Messung im Flüssigkeitsszintillationscounter mit der Proteinmenge der lysierten Zellen korreliert. Es wurden die Oatp1b-Varianten von Pferd (equOatp1b4), Rind (btOatp1b4), Schwein (susOatp1b4), Katze (fcOatp1b4) und Ratte (rOatp1b2) eingesetzt. Als Kontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen. Dargestellt sind jeweils die MW  $\pm$  SD eines repräsentativen Experiments mit n=4 Bestimmungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *One way ANOVA*. \*\*\*Signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit  $p < 0,001$ .

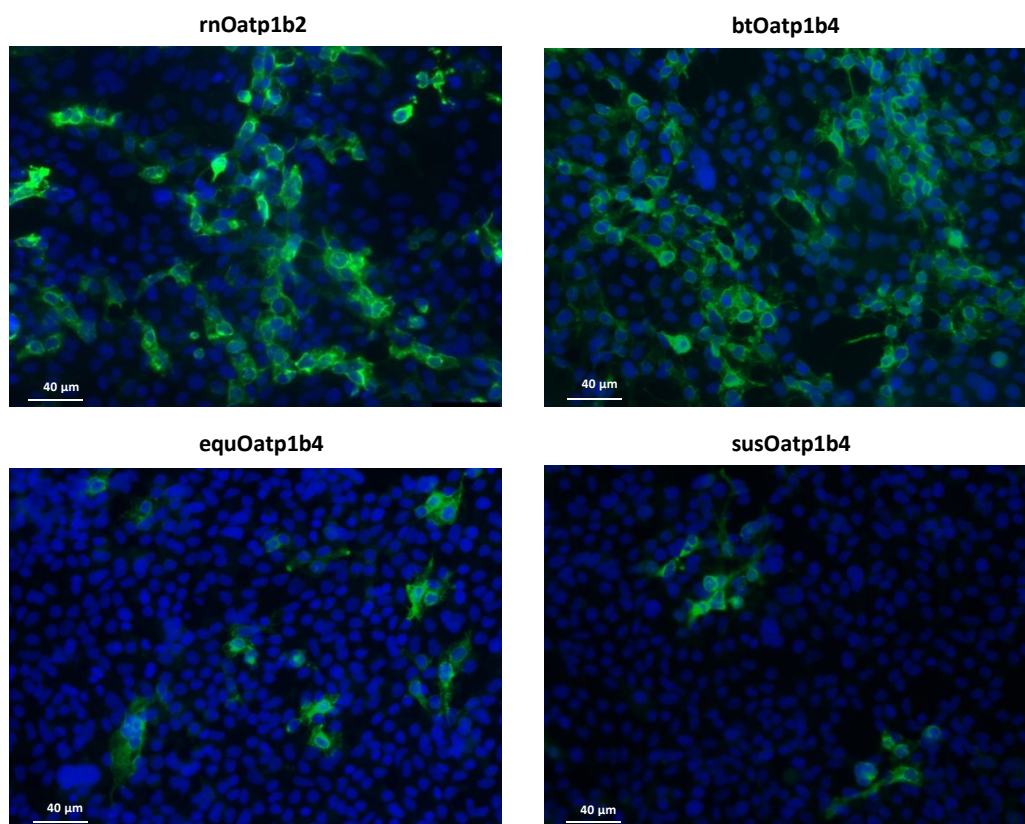
#### 4.2.3 Nachweis der Oatp1b-Proteine mit dem *Maus anti-V5* Antikörper

Mittels Immunfluoreszenz wurden Transfektionsrate und Lokalisation der Oatp1b-Proteine überprüft. Zusätzlich diente die *Western Blot* Analyse zum Proteinnachweis. Hierfür wurde bei den bereits in den Transportexperimenten verwendeten Plasmiden eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt, bei welcher das Stopcodon entfernt wurde, sodass der V5-tag des Vektors abgelesen werden konnte. Mit einem etablierten, gegen den V5-tag gerichteten Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe) konnten nun Immunfluoreszenz und *Western Blot* mit transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen durchgeführt werden.



#### 4.2.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen

Der Nachweis der V5-His-markierten Proteine erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Hierbei wurde der *Maus anti-V5* Antikörper mit dem fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper *Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelten anti-Maus* nachgewiesen und somit das entsprechende Protein dargestellt. Für das Oatp1b2-Protein der Ratte konnte wie zuvor (siehe Abb. 4.13) ein deutliches Signal detektiert werden, welches auch vorwiegend in der Zellmembran lokalisiert war. Das Oatp1b4-Protein des Rindes stellt sich ebenso dar. Bei den anderen Tierarten konnte bei deutlich weniger Zellen ein Fluoreszenzsignal detektiert werden.

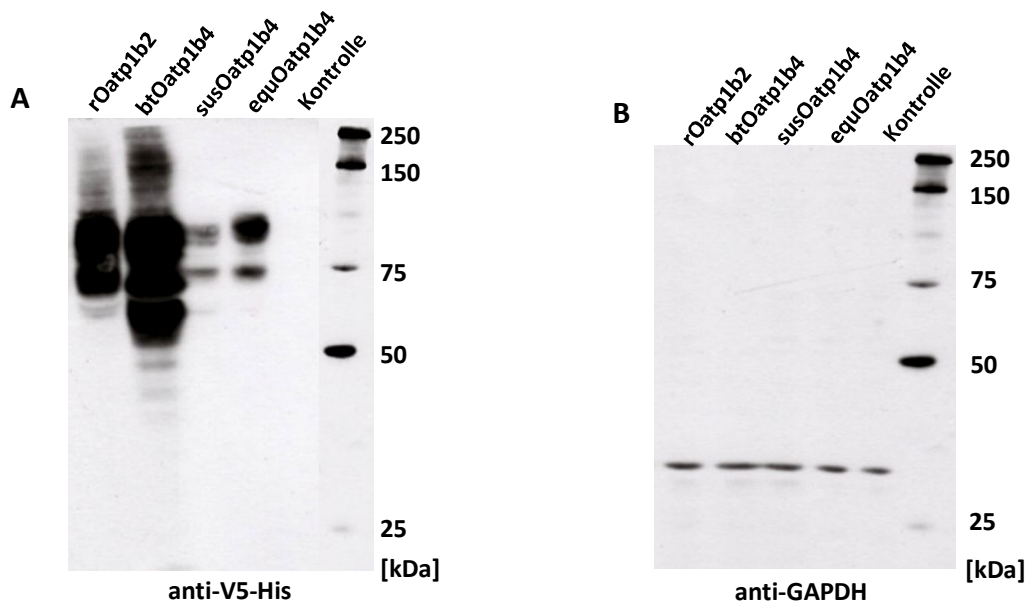


**Abb. 4.20: Immunfluoreszenz der mit den Oatp1b-Varianten von Ratte, Rind, Pferd und Schwein transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen**

Für die Immunfluoreszenz wurden GripTite 293 MSR-Zellen auf Deckgläschen in 24-Well-Schalen kultiviert und mit Plasmiden der Oatp1b-Varianten der verschiedenen Tierarten transient transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Immunzytochemie. Hierbei wurde der *Maus anti-V5 Antikörper* (1:5.000) als Primär- und der *Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelte anti-Maus* (1:800, grün) als Sekundärantikörper verwendet. Mit beiden Antikörpern wurden die Zellen jeweils für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellkernfärbung mit DAPI (1:5.000, blau). Dargestellt ist eine Übersichtsaufnahme in 40-facher Vergrößerung.

#### 4.2.3.2 Western Blot Analyse

Für die *Western Blot* Analyse wurden ebenfalls die V5-His-markierten Proteine verwendet. Nach Proteinextraktion aus transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen mit RIPA-Puffer wurde jeweils 30 µg Protein auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend wurden Gellauf und Blotting durchgeführt. Der *Maus anti-V5* Antikörper detektierte die V5-His-markierten Proteine bei allen Tierarten mit zwei verschiedenen scheinbaren Molekulargewichten von ~85 kDa und ~73 kDa (Abb. 4.21). Bei Oatp1b4 des Rindes ist sogar noch eine dritte Bande von noch kleinerem Molekulargewicht zu erkennen. Bei Ratte und Rind ist insgesamt mehr Oatp1b-Protein detektierbar, als bei den Oatp1b4 Proteinen von Schwein und Pferd. Dies liegt jedoch nicht an einem unterschiedlichen Auftrag von Gesamtprotein, wie die Färbung mit dem anti-GAPDH Antikörper bestätigt.



**Abb. 4.21: Western Blot Analyse von rOatp1b2 sowie Oatp1b4 von Rind, Schwein und Pferd**

GripTite 293 MSR-Zellen wurden mit den Oatp1b-Plasmiden von Pferd (equOatp1b4), Rind (btOatp1b4), Schwein (susOatp1b4) und Ratte (rOatp1b2) transient transfiziert. Als Kontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen. Die Proteinexpression der Oatp1b-Varianten wurde mittels des *Maus anti-V5* Antikörpers (1:5.000) dargestellt (**A**). Als Kontrolle des Proteinauftrags wurde bei allen Proben GAPDH mittels anti-human GAPDH Antikörper (1:25.000) (**B**) nachgewiesen. Die Belichtungszeit betrug jeweils 2 min.



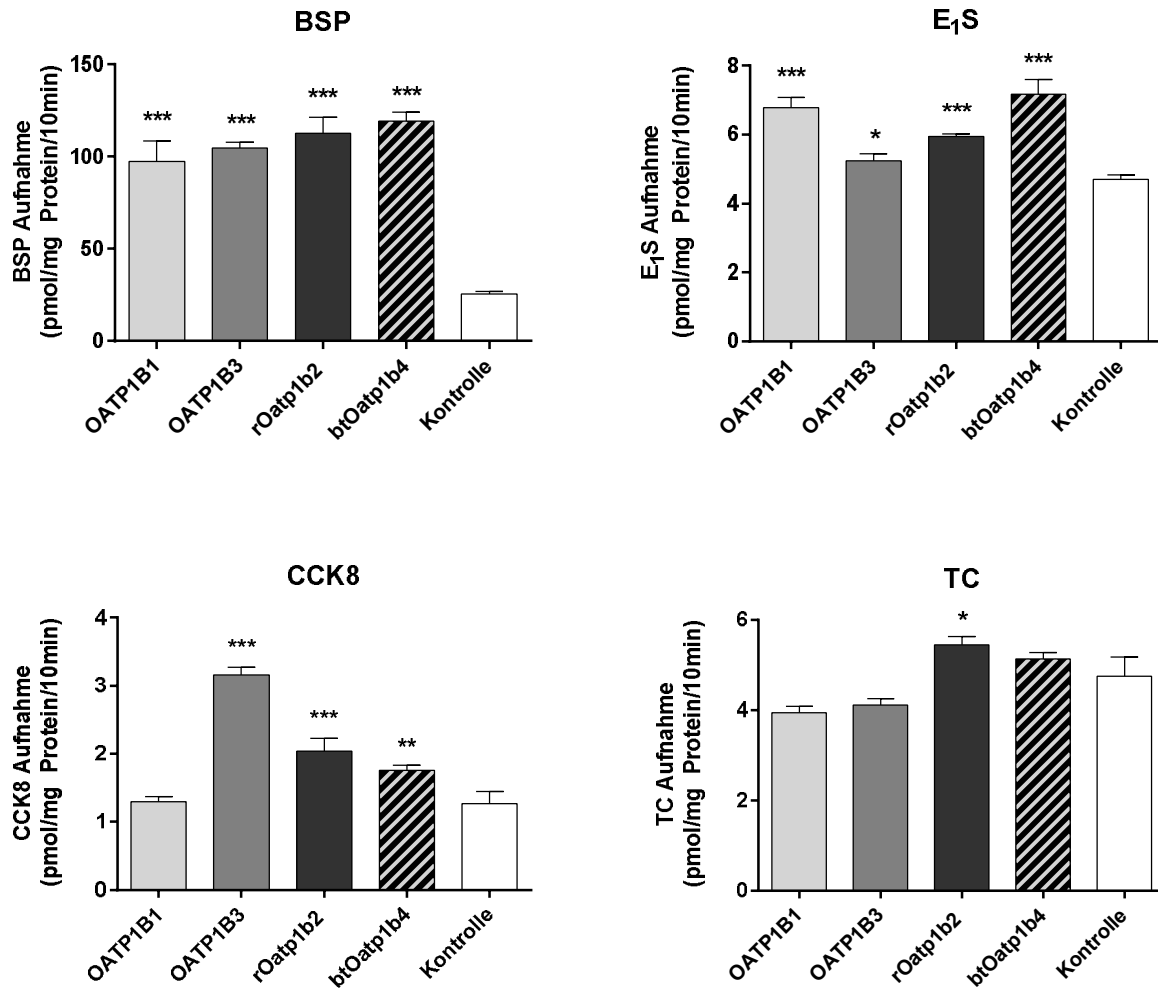
### 4.3 Funktionelle Charakterisierung des bovinen Oatp1b4

Bei den Aufnahmeversuchen der Oatp1b-Varianten der verschiedenen Tierarten konnte im Gegensatz zu den Oatp1b4-Transportern von Katze, Pferd und Schwein eine gute Aufnahmeleistung des Oatp1b4 des Rindes beobachtet werden. Döring konnte 2003 den btOatp1b4 aus der Leber des Rindes isolieren und klonieren (Döring 2003). In *Xenopus laevis* Oozyten ließ sich ein signifikanter Transport von TC, E<sub>1</sub>S, Estradiol-17 $\beta$ -glucuronid und LTC<sub>4</sub> nachweisen. Bislang lagen jedoch keine Studien im Zellkulturmodell zu dem Oatp1b4-Transporter des Rindes vor. Zunächst wurde der btOatp1b4 in den *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* Vektor subkloniert und anschließend transient in GripTite 293 MSR-Zellen transfiziert. Es wurden Aufnahmeversuche mit [<sup>3</sup>H]BSP, [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S, [<sup>3</sup>H]TC und [<sup>3</sup>H]CCK8 vergleichend zu den humanen OATP1B1 und OATP1B3 durchgeführt, sowie ein zeit- und konzentrationsabhängiger Transport von E<sub>1</sub>S.

#### 4.3.1 Substrataufnahme vergleichend zu OATP1B1 und OATP1B3

Unter Verwendung der Substanzen BSP, E<sub>1</sub>S, TC und CCK8 wurde der btOatp1b4 funktionell charakterisiert und mit den Transporteigenschaften der humanen OATP1B1 und OATP1B3 verglichen. Hierfür wurden GripTite 293 MSR-Zellen mit den in *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* Vektor klonierten Konstrukten transient transfiziert. Als Positivkontrolle wurde der Oatp1b2 Transporter der Ratte mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen. 48 h nach der transienten Transfektion erfolgten 10-minütige Aufnahmeversuche mit den radioaktiv markierten Substanzen.

Für BSP und E<sub>1</sub>S konnte eine signifikante Aufnahme für den Oatp1b4 des Rindes gezeigt werden. TC wurde in dieser Studie nur in geringer Ausprägung von rOatp1b2 und btOatp1b4 transportiert, nicht jedoch von OATP1B1 und OATP1B3. Für CCK8, welches ein Substrat von OATP1B3 nicht jedoch von OATP1B1 ist, konnte ebenfalls eine Aufnahme des btOatp1b4 gezeigt werden.

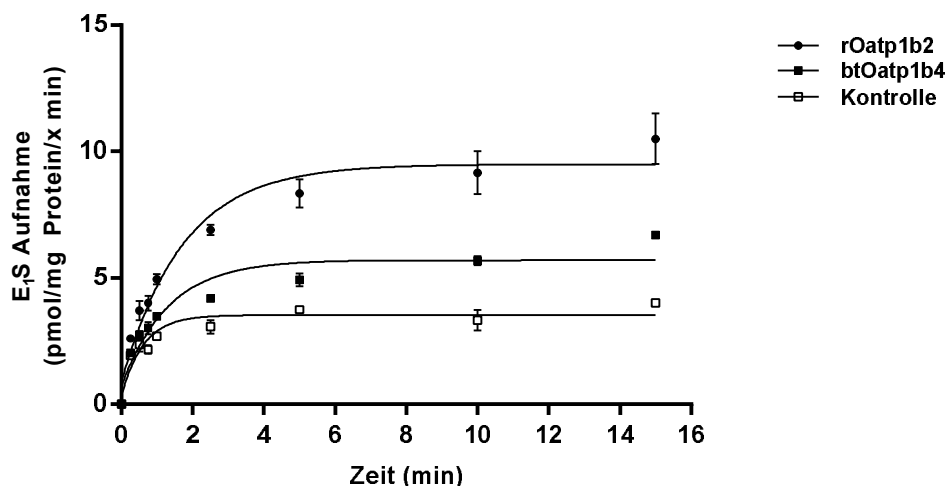


**Abb. 4.22: Aufnahmestudien mit BSP, E<sub>1</sub>S, CCK8 und TC in mit OATP1B1, OATP1B3, rOatp1b2 und btOatp1b4 transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen**

Für diese Aufnahmestudien wurden [<sup>3</sup>H]BSP (0,5  $\mu$ M), [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S (1  $\mu$ M), [<sup>3</sup>H]TC (1  $\mu$ M) und [<sup>3</sup>H]CCK8 (0,5  $\mu$ M) verwendet. Die Aufnahme der Substanzen wurde über 10 min bei 37°C gemessen und die aufgenommene Radioaktivität nach Messung im Flüssigkeitsszintillationscounter mit der Proteinmenge der lysierten Zellen korreliert. Es wurden die humanen Transporter OATP1B1 und OATP1B3, der Oatp1b4-Transporter des Rindes (btOatp1b4) und der Oatp1b2-Transporter der Ratte (rOatp1b2) eingesetzt. Als Kontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD eines repräsentativen Experiments mit n=4 Bestimmungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *One way ANOVA*. \*Signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01 und \*\*\* $p$ <0,001.

### 4.3.2 Zeitabhängigkeit

Die Zeitabhängigkeit der Aufnahme wurde für btOatp1b4 und rOatp1b2 nach transienter Transfektion in GripTite 293 MSR-Zellen untersucht. Die Aufnahme von 1  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Hierbei zeigte sich eine lineare Aufnahme bis zu 1 min, sodass die nachfolgende konzentrationsabhängige Aufnahme von E<sub>1</sub>S bei 1 min stattfinden konnte.

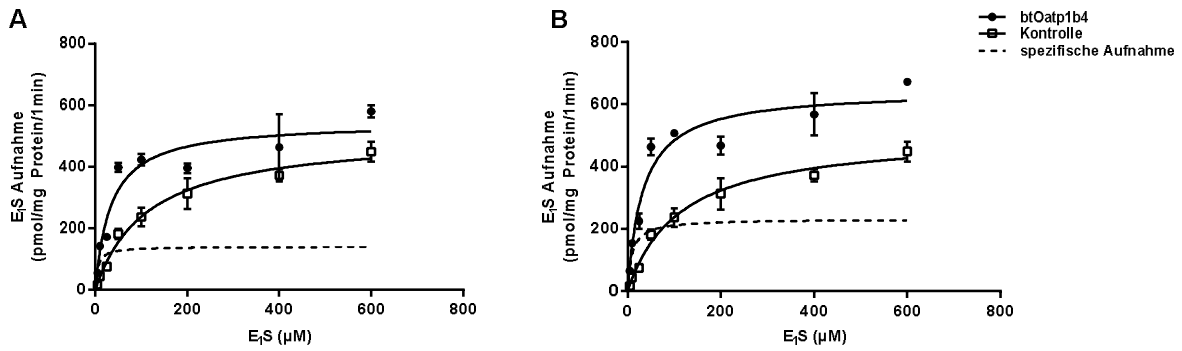


**Abb. 4.23: Zeitabhängige Aufnahme von  $[H^3]E_1S$  über rOatp1b2 und btOatp1b4 in transient transfizierten GripTite 293 MSR-Zellen**

Dargestellt ist die Aufnahme von  $1 \mu M [H^3]E_1S$  zu folgenden Zeitpunkten: 15 s, 30 s, 45 s, 1 min, 2,5 min, 5 min, 10 min und 15 min. Es zeigte sich eine lineare Aufnahme bis 1 min.

### 4.3.3 Kinetik der btOatp1b4-vermittelten Aufnahme

Die konzentrationsabhängige Aufnahme von  $E_1S$  wurde bei 1 min mit aufsteigender Konzentration ( $1 \mu M$ ,  $5 \mu M$ ,  $10 \mu M$ ,  $25 \mu M$ ,  $50 \mu M$ ,  $100 \mu M$ ,  $200 \mu M$ ,  $400 \mu M$  und  $600 \mu M$ ) des Substrats gemessen, sodass letztendlich eine Sättigung zu beobachten war. Dargestellt wurde die  $E_1S$ -Aufnahme zu der entsprechenden Konzentration. Die spezifische Aufnahme wurde durch Subtraktion der Aufnahmemenge der Kontrollzellen von der Aufnahmemenge des btOatp1b4 bzw. rOatp1b2 berechnet. Mit Hilfe des Programms *Graph Pad Prism 6* wurden die kinetischen Parameter  $K_m$  (Michaelis-Menten-Konstante) und  $V_{max}$  (maximale Aufnahmegeschwindigkeit) durch Anwendung der nicht-linearen Regression nach Michaelis-Menten berechnet. Für den Oatp1b2-Transporter der Ratte wurde bei einem Experiment ein  $V_{max}$  von  $140,2 \pm 27,7$  pmol/mg protein/min und ein  $K_m$ -Wert von  $5,4 \pm 6,8 \mu M$  berechnet und für den Oatp1b4-Transporter des Rindes ein  $V_{max}$  von  $231,6 \pm 30,6$  pmol/mg protein/min und ein  $K_m$ -Wert von  $9,5 \pm 6,8 \mu M$ .



**Abb. 4.24: Konzentrationsabhängige Aufnahme von E<sub>1</sub>S über btOatp1b4 und rOatp1b2 in GripTite 293 MSR-Zellen**

Mit rOatp1b2 (A, ●), btOatp1b4 (B, ●) und Leervektor (A, B, □) transient transfizierte GripTite 293 MSR-Zellen wurden 1 min mit den angegebenen Konzentrationen [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S bei 37°C inkubiert. Die aufgenommene Radioaktivität wurde nach Messung im Flüssigkeitsszintillationscounter mit der Proteinmenge der lysierten Zellen korreliert. Dargestellt ist die nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten von einem Experiment in Dreifachbestimmung. Die spezifische Aufnahme (---) wurde durch Subtraktion der Aufnahmemenge der Kontrollzellen von der Aufnahmemenge der rOatp1b2- bzw. btOatp1b4-Zellen berechnet. Aus der spezifischen Aufnahme erfolgte die Berechnung der kinetischen Parameter  $V_{\max}$  und  $K_m$  mit Hilfe des Programms *Graph Pad Prism 6*. Die Werte entsprechen MW  $\pm$  SD.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse der OATP1B-Mitglieder

In dieser Arbeit wurden die Mitglieder der OATP1B-Subfamilie bei verschiedenen Tierarten untersucht. Zu den humanen Vertretern OATP1B1 und OATP1B3 sind bereits viele Daten publiziert und in verschiedenen Reviews zusammengefasst worden (König et al. 2006; Niemi et al. 2011; Nakanishi und Tamai 2012; Hagenbuch und Stieger 2013). Bei Maus und Ratte wurden ebenfalls aufgrund ihres Einsatzes als Versuchstiere in Forschungsprojekten und präklinischen Studien einige Studien zu Oatp1b2 durchgeführt (Cattori et al. 2000, 2001; Meyer zu Schwabedissen et al. 2009; Pacyniak et al. 2011), wohingegen bei den Haussäugetieren Hund, Katze, Pferd, Rind und Schwein sowie dem Huhn kaum Daten in der Literatur verfügbar sind. Aufgrund genomischer Analysen konnte gezeigt werden, dass bei diesen Tierarten im Vergleich zum Menschen nur ein Vertreter der OATP1B-Subfamilie anzutreffen ist (Hagenbuch und Meier 2003). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Oatp1b-Mitgliedern bei den verschiedenen Tierarten mit den humanen Varianten OATP1B1 und OATP1B3 zeigte für OATP1B1 die höchste Sequenzidentität zum Oatp1b4 des Schweins (70,3 %) und für OATP1B3 mit 72,4 % die größte Übereinstimmung zum Oatp1b4 der Katze. Von allen Tierarten sind sich die Oatp1b4-Sequenzen von Hund und Katze mit einer Sequenzidentität von 85,1 % am ähnlichsten. Der Oatp1b3 vom Huhn ist verwandtschaftlich am weitesten von allen anderen OATP1B-Sequenzen entfernt.

**Tab. 5.1: Aminosäureidentität der Oatp1b-Proteine der verschiedenen Spezies in %**

Die Identitäten der Proteine wurden mit der MegAlign Software unter Zuhilfenahme des *Clustal W* Algorithmus ermittelt.

Divergenz (%)	Identität (%)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	1	79,6	64,4	63,5	68,8	69,6	70,0	70,0	70,3	49,8	
	2	23,8	66,2	64,7	71,3	72,4	70,5	70,5	70,8	49,6	
	3	48,0	44,7	81,8	62,7	62,8	60,4	63,1	61,9	50,1	
	4	49,8	47,5	20,9	63,4	61,9	60,7	62,1	61,7	48,5	
	5	40,3	36,2	51,2	50,0	85,1	72,1	73,4	73,3	49,3	
	6	39,0	34,5	51,1	52,7	16,7	71,0	73,2	71,7	50,6	
	7	38,3	37,5	55,8	55,2	35,0	36,7	72,7	80,4	49,4	
	8	38,2	37,4	50,4	52,3	32,9	33,1	34,0	74,0	50,1	
	9	37,7	37,0	52,9	53,1	33,0	35,5	22,7	31,9	50,6	
	10	80,4	81,0	79,7	84,0	81,8	78,3	81,4	79,7	78,3	
											OATP1B1
											OATP1B3
											Oatp1b2 Maus
											Oatp1b2 Ratte
											Oatp1b4 Hund
											Oatp1b4 Katze
											Oatp1b4 Rind
											Oatp1b4 Pferd
											Oatp1b4 Schwein
											Oatp1b3 Huhn

OATP1B1	1	-----MD-----	QNOHLNKTAEAQPSSENKKT	-RYCNGLMFLAALSLSFI	AKTL
OATP1B3	1	-----MD-----	QHOHLNKTAESASSEKKKT	-RRCNGFKMFLAALSFSY	IAKAL
mOatp1b2	1	-----MD-----	QTOH--PSKAAQPLRSEKT	-RHCDGFRIFLAALSFSY	ICKAL
rOatp1b2	1	-----MD-----	HTQOSRKAAEAQPSRSKQT	-RFCDGFKLFLAALSFSY	ICKAL
cfOatp1b4	1	-----MD-----	SNQOLKKTAEVTPPKERET	-KCCNGFKMFLVALSFSF	MCKAL
fcOatp1b4	1	-----MD-----	PNQHLKKTAETTPSEKRET	-RCCNGFRMFLVALSLSF	MCKAL
btOatp1b4	1	-----MD-----	QNHHSDKTAEAQPSSEKKT	TRNCCNGFKMFLAALSLS	SFISKAL
equOatp1b4	1	-----MD-----	QNOHLNNSTEAQPSSRKKT	-KCCNGFKLFFAALTLSF	ICKAL
susOatp1b4	1	-----MA-----	QNOHLSKTTTEAQSSEKKKT	-RWCDGFKMFLAALSLSF	SISKAL
ggOatp1b3	1	MTAETESSNIDDSNQEAEP	SQLLDYETSEN-LPVKKKAS	CCTGLKVFLAALSFSY	FSKAL

OATP1B1	44	GAIMKSSIIHIERRFEISS	IVGFIDGSFEIGNLLVIV	FVSYFGSKLHRPKLIGIG	CFI
OATP1B3	44	GGIMKTSITQIERRFDISS	IAGLIDGSFEIGNLLVIV	FVSYFGSKLHRPKLIGIG	LL
mOatp1b2	42	GGVIMKSSITQIERRFDIP	SSISGLIDGGFEIGNLLVIV	FVSYFGSKLHRPKLIGT	GCFI
rOatp1b2	44	GGVIMKSSITQIERRFDIP	SSISGLIDGGFEIGNLLVIV	FVSYFGSKLHRPKLIGIG	CFI
cfOatp1b4	44	GGVIMKSSITQIERRFDISS	ISGLIDGGFEIGNLLVIV	FVSYFGSKLHRPKIIGIG	CFI
fcOatp1b4	44	GGVIMKSSITQIERRFDISS	VSGLIDGGFEMGNLFVIV	FVSYFGSKLHRPKIIGIG	CFI
btOatp1b4	45	GAVIMKSSITQIERRFDISS	TVGLIDGSFEIGNLLVIV	FVSYFGAKLHRPKLIGIG	CFI
equOatp1b4	44	NAVIMKSSITQIERRFDI	ISSVGLIDGSFEMGNLFVIV	FVSYFGSKLHRPKIIGIG	CFI
susOatp1b4	44	SAVIMKSSITQIERRFDISS	TVGLIDGSFEIGNLFVIV	FVSYFGAKLHRPKLIGIG	CFI
ggOatp1b3	60	SGVIMKSSITQIERRFDIP	SSITVGFIDGSFEMGNLLVIA	FVSYFGAKLHRPKVIAAG	CFT

OATP1B1	104	MGIIGGLTALPHFFMGYYR	YSKETNNINSSSENSTSL	STCLINQILSLN	RASPEIVGKGCL
OATP1B3	104	MGTGSILTSPLPHFFMGYYR	YSKETHINPSENSTSSL	STCLINQTL	SFNGTSPEIVEKDCV
mOatp1b2	102	MGIIGSILTALPHFFMGYYR	YATENDISSLHNST---	LTCLVNQTTSLTGT	SPEIMEKGCE
rOatp1b2	104	MGIIGSILTALPHFFMGYYR	YAKENDIGSLGNST---	LTCFINQMTSPTG	PSPEIVEKGCE
cfOatp1b4	104	MGTGSILTALPHFFMGYYR	YSKETHINPSENLTSS	FPTCLLGNLLN	RNTSPEIVEKGCE
fcOatp1b4	104	MGTGSILTALPHFFMGYYR	YSKESLVNPSENLTIS	SFSTCSISEN	FLNNTSPKIVEKGCE
btOatp1b4	105	MGTGSILTALPHFFMGYYR	YSKDTTFNPSENSTSL	NLPTCSINQNL	LPNRTSLEVVGKLE
equOatp1b4	104	MGTGSILTALPHFFMGYYR	YSKETLVNPSENSTSSL	STCLMDQTL	LLNTTSPEIVGQGHE
susOatp1b4	104	MGIIGSILTALPHFFMGYYR	YSKDTFISPLENSTSGL	STCSNQNQL	LLNGTSPEMVGKLE
ggOatp1b3	120	MGIIGSILTALPHFFMGYYR	YETASDTRSSANTTSS	INPCSPHQDL--	NETFLDTSHSACE

OATP1B1	164	KESGSYMWIYVFMGNMLR	IGETPIVPLGLSYIDDF	AKEGHSSLYLGLIL	NAIAMIGPIIG
OATP1B3	164	KESGSHMWIYVFMGNMLR	IGETPIVPLGLISYIDDF	AKEGHSSLYLGLSL	NAICMIGPVIG
mOatp1b2	159	KGSNSYTWIYVLMGNMLR	IGETPIVPLGLSYIDDF	AKEGNSSMYLGL	TLHTIAMIGPILG
rOatp1b2	161	KGLKSHMWIYVLMGNMLR	IGETPIVPLGLISYIDDF	AKEGHTSMHLGL	TLHTIAMIGPILG
cfOatp1b4	164	KESGSYTWIYVLMGNMLR	IGETPIVPLGLISYIDDF	AEEGHSSFYLGL	TLHAISMIGPIIG
fcOatp1b4	164	KESGSYTWIYVLMGNMLR	IGETPIVPLGLISYIDDF	AETGHSSFYLGL	TLHAISMIGPIIG
btOatp1b4	165	KDSGSYMWIYVLMGNMLR	IGETPIGPLGISYIDDF	AEEGHSSLYLGN	LAVTMIGPIIG
equOatp1b4	164	KESVSYAWIYVLMGNMLR	IGETPIGPLGISYIDDF	AKEGHSSFYLGL	SLNAMAMAGPVTG
susOatp1b4	164	KESGSYMWIYVLMGNMLR	IGETPIMPLGISYIDDF	AKEGHSSFYLGN	LYAVGMIGPILG
ggOatp1b3	178	KEPSSYMWIYVLMGNMLR	IGETPIITPLGISYIDDF	AKEENVPVYVAC	LHTIAMLGPMC

OATP1B1	224	FTLGSLFSKMYVDIGYVDL	STIRITPTDSRWVGAWWL	NFLVSGLFSI	ISSIPFFFLPQTP
OATP1B3	224	FALGSLFAKMYVDIGYVDL	STIRITPKDSRWVGAWWL	GFLVSGLFSI	ISSIPFFFLPKNP
mOatp1b2	219	FIMSSVFAKIYVDVGYVDL	RSVRITPQDARWVGAWWL	GFLVNGLLCII	CSIPFFFLPKIP
rOatp1b2	221	FIMSSVFAKIYVDVGYVDL	NSVRITPNDARWVGAWWL	SFIVNGLLCIT	SSIPFFFLPKIP
cfOatp1b4	224	FIOGSLFAKMYVDIGYVDL	SDIRITPKDSRWVGAWWL	GFLVAGILSIM	SSIPFFFLPRDL
fcOatp1b4	224	FIOGSLFAKMYVDIGYVDL	SSIRITPKDSRWVGAWWL	GFLVAGLLSIM	SSIPFFFLPQNL
btOatp1b4	225	FILVSOFSKMYVDIGYVDL	STIRITPKDSRWVGAWWL	GFLAAGLIAI	ISSIPFFFLPKTL
equOatp1b4	224	LILASQFAKMYVDIGYVDL	RSIRITPDSRWVGAWWL	GFLVAGLLSI	ISSIPFFFLPSSL
susOatp1b4	224	FSLGSLFSKMYVDIGYVDL	STIRITPKDSRWVGAWWL	GFLVAGILSI	ISSIPFFFLPKSL
ggOatp1b3	238	FTLGSLCAKIYVDVGYVDL	GKTAITPQDSRWVGAWWL	GFLTAGVISFIA	AIPFCFLPKSL

OATP1B1	284	NKPOKERKASLSL-HVLETNDEKDOTANLTNOGKNITKNVTGFFQSFKSILTNPLYVMFV
OATP1B3	284	NKPOKERKISLSL-HVLKTNDDRNOTANLTNOGKNVTKNVTGFFQSLKSILTNPLYVIFL
mOatp1b2	279	KPSOKERKNSASL-HVLKTDDEKNPVTNPTTQEKQAPANLTGFLWSLSILTNEQYVIFL
rOatp1b2	281	KPSOEERKNSVSL-HAPKTDEEKHMTNLTQEEQDPSNMTGFLRSLRSILTNEIYVIFL
cfOatp1b4	284	NKPOEERKNLTSL-HLLKTNEERSQMTNVTNHGQSLSGNITGFFQSLKSILTNPLYVILQ
fcOatp1b4	284	DKPOKESKDLGSS-HFLKTNEKRSQIANVTNHGQNISENITDFFQSLKSILTNPLYVILL
btOatp1b4	285	NKPNKEKASASSVSLPMKNEEKSOASLTKTGQNVTDVTGFLQSLKSILTNPLYVITL
equOatp1b4	284	DKPOKERKVSIISS-HLLKTNEEKSOITNLTNPROKITEHTGLIQSLKSILTNPLYMIVL
susOatp1b4	284	DKPOKERKA---SVPLPVQKEERSQIVNLTKDRQNTKTNGFIQSLKSILTNPLYVITL
ggOatp1b3	298	KKELDKANKDKTSPGLLENMGAMRKTLPSSVSKSPAKWSTMKDFYTSLLKILSNRMYVTFL

OATP1B1	343	LLTLLQVSSMIGAFYYVFKYVEQQYGQPSKANILLGVITIPIFASGMFLGGYIICKKFKL
OATP1B3	343	LLTLLQVSSFIGSFTYYVFKYVEQQYGQSASHANFLLGIITPTVATGMFLGGFIICKKFKL
mOatp1b2	338	LLTLLQVSSFIGSFTYYLKFIEQQFGQTASQANFLLGVITIPTMASGMFLGGYLIKRLKL
rOatp1b2	340	LLTLLQVSGFIGSFTYYLKFIEQQFGRTASQANFLLGIITPTMATAMFLGGYIVKKFKL
cfOatp1b4	343	FLTLLASSHIGAITYYVFKYVEQQYGQSASEANIWLGTITLPTVATGIFVGGYIICKKFKL
fcOatp1b4	343	FSLLSSSHHIGAITYYVFKYVEQQYGQSASEANVFLGTITLPTVATGIFTGGYIICKKFKL
btOatp1b4	345	FLTLLQASSHIGSITYVFKYVEQQYGNASSETSILLGFISIPSLAAGMFTGGFIVKKKFKF
equOatp1b4	343	FLTLLQISSFIGAFYYAFKYVEQQYGQSASETNMLFGMTAIPITISIGMFTGGYIICKKFKF
susOatp1b4	341	FLTLLQASSVIGSFTYYVFKYVEQQYGQSASETNILFGFITIPTFTATGIFSGGYIVRKFKL
ggOatp1b3	358	CCSLLQVSSFIGFLTYKPKYMEMQYGQSASKSNFLIGLITSLPPVGIGIFLGGIIMKKYKM

OATP1B1	403	NTVGIKAFSCFTAVMSLSFYLLYFFIICENKSVAGLTMTYDGNNPVTSHRDVPLSYCNSD
OATP1B3	403	SLVGIKAFSFLTSMISFLFQLLYFPLICESKSVAGLTLTYDGNNVASHVDVPLSYCNSE
mOatp1b2	398	TLVGIKKEVFFTTTMAVVFYLSYFLLICENKAFAGLTLTYDGMNPVDSHIDVPLSYCNSD
rOatp1b2	400	TSVGIKKEVFFTSSVAFQFLYFPLICENKPFAGLTLTYDGMNPVDSHIDVPLSYCNSD
cfOatp1b4	403	TLVGIKLSFCTSLSLFQLITFALICESKPVAGLTLTYDGNNPVTSPINVPLSYCNSN
fcOatp1b4	403	SLVGIKLSFCTSAALIFQQFNFAVICESKSVAGLTLTYDGNNPVASHINVPLSYCNSD
btOatp1b4	405	TLVGIKFSLCAHMTSFLHLLNFALICENKSVAGLTLTYDGNTPVASHINVPLSYCNSD
equOatp1b4	403	TLVGIKFSFATSLVSFSFHLNFALICESKPVAGLTLTYDGNNPVASHINVPLSYCNSD
susOatp1b4	401	TLVGIKLSFYTSALAFIFHLLNFALICENKSVAGLTLTYDGNNPLSSHINAPLSYCNSD
ggOatp1b3	418	SLTTATKEAFTMSFLAYSFTLLHFFVGCENQVITAGITASYGDK-PIPYHENAIIFSDCNSG

OATP1B1	463	CNCDESQWEPVCGNNGITYILSPCLAGCKSSSGNKKP--IVFYNCSCLEVTGLQNRNYSAH
OATP1B3	463	CNCDESQWEPVCGNNGITYILSPCLAGCKSSSGIKKH--TVFYNCSCVEVTGLQNRNYSAH
mOatp1b2	458	CTCDKNQWEPVCGENGITYILSPCLAGCKSFRGDKKLMNTEFYDCSCVSGSGFQKGNHSAR
rOatp1b2	460	CSCDKNQWEPICGENGITYILSPCLAGCKSFRGDKKPNNTEFYDCSCISNS---GNNSAH
cfOatp1b4	463	CNCDENDWEPVCGDSGITYILSPCLAGCKSSSGSKKS--MVFNHCSCVEVTGVQNKNNSVN
fcOatp1b4	463	CNCDESHWEPVCGANGITYILSPCLAGCKSSSGNKKKS--IVFYNCSCVEVTGVQNKNNSVN
btOatp1b4	465	CNCDPQWEPICGNGITYILSPCLAGCTSSSGSKKS--IVFNHCSCVEENGFGQSKNNSMK
equOatp1b4	463	CNCDEKNQWEPVCGYNGITYILSPCLAGCNSSSGNKKP--IVFYNCSCVEATGFQNGNNSAH
susOatp1b4	461	CNCDEKSQWEPVCAADNGITYILSPCLAGCKSSSGSKKS--MVFNHCSCVEVNDVFQTRNNSVK
ggOatp1b3	477	CKCATNVWDVPCGGNGITYILSACLACTISEGHGKN--MVFNHCSCLEASSWSGNNSVT

OATP1B1	521	LGECPRDDACTRKFFYFVAIQVLNLFSSALGGTSHVMLIVKIVQPELKSALGFHSMVIR
OATP1B3	521	LGECPRDNTCTRKFFIYVAIQVINSLSFATGGTTFIILLTVKIVQPELKALAMGFQSMVIR
mOatp1b2	518	LGECPRD-KCKTKYFYITTFQVITISFFITALGSTSLMLILIRSVQPELKSALGMGFHSLVVR
rOatp1b2	516	LGECPRY-KCKTNYFYIILQVTVSFFITAMGSPSLILILIMKSVQPELKSALAMGFHSLIIR
cfOatp1b4	521	LGECPRDSQCRKFFIYALVQVLNLYFFSSLGSIPTIMLVFKNVQPELKSALAVGFHSLTIR
fcOatp1b4	521	LGECPRDNHCTKFFIYVILVQVLNLYFFSSLGSTPTIMLVFKNVQPELKSALAVGFHSLTIR
btOatp1b4	523	LGECPRSDDCRKRFFIYIVVQILTLFSAALGSTSNIMLIFKNVEPELKSALAMGFHSLTIR
equOatp1b4	521	LGECPRDDCKRKFFYFYLAVQTMHYFFITALGGASTFMLIFKNVQPELKSALAVGFHALTIR
susOatp1b4	519	LGECPRNDQCRKFFIYIVVQILILIFFSSSLGTISNMMLIFKNVQPEMKSLAVGFHSLTIR
ggOatp1b3	535	LGQCPKSDDCSMMFIYITVIQVVSFGCYALGGTPAYLIMYRCVQPELKSALAVGLYTLVVR

OATP1B1	581	ALGGILAPIYFGALIDTTCIKWSTNNCGTRGSCRTYNSTSF	SRVYLGLSSMLRVSSLVLY
OATP1B3	581	TLGGILAPIYFGALIDKTCMKWSTNSCGAQQACRIYNSVFF	GRVYLGLSIALRFPALVLY
mOatp1b2	577	TLGGILAPIYFGALIDRTCMKWSVTSCGARGACRLYNSR	LFGMIYVGLSIALKTPILLLY
rOatp1b2	575	ALGGILAPIYFGAFIDRTCIKWSVTSCGKRGACRLYNSR	LFGFSYLGLNLALKTPPLFLY
cfOatp1b4	581	ALGGIPAPIYFGALIDRACMKWSTSSCGKPGFCRMYNST	LYGNTFLSLIESLKFFASLT
fcOatp1b4	581	ALGGIPAPIYFGALIDKTCMKWSTSSCGKRGSCRLYNSR	LYGNTYLGLIVSLRFSALILL
btOatp1b4	583	TLGGIPAPIYFGALIDRACMKWSINNYGKQGSCLYNSLL	YGHTFFGLTTGLKFPALVLF
equOatp1b4	581	ALGGIPAPIYFGALIDRACMKWSINSHGKRGSCRTYN	SILYGYTYWGLMDSLKFAALILY
susOatp1b4	579	TLGGIPAPIYFGALIDRACMKWSINNSGKQGSCLYNS	TLYGNTFFGLSTCLKLPPLVLY
ggOatp1b3	595	MLAGIPAPYFGALIDKTCIKWASTRCGQACRLYDSNA	FRVYVYLGLSAVLRAPSYLLA
OATP1B1	641	IIILIMAMKKKYQEKDINASEN-GSVMDEANLES	LNKNKHFPVSAGAD-SETHC-----
OATP1B3	641	IVFIEAMKKKYQKDKTKASDNERKVMDEANLEFLN	NGEHFPVSAGTD-SKTCNLDMQDNA
mOatp1b2	637	VALLIVMKRKMKRNDNKILENGRKFTDEGNPEPV	NNNGYSCVPSDEKNSETPL-----
rOatp1b2	635	VVLIVFTKRKYKRNDNKILENGRQFTDEGNPDSV	NKNGYCVPYDEQSNETPL-----
cfOatp1b4	641	AVLIITMKKIYQKDKTKASENGRKDTNEANLES	LNNDGYFVPSARED-NETHM-----
fcOatp1b4	641	VVLITMKKIYQKDKTKASENGRKDMNEANLEPL	NNDGYFVPSSDNE---AHM-----
btOatp1b4	643	VVLIEAMKKKYQKDKTKASENETKAVNEANS	GPLINDA-----KVD-HETHI-----
equOatp1b4	641	VVLITMKKKLQKDKTKASENGKKAMNEANLES	LNDCGHSVPPARAD-GETHF-----
susOatp1b4	639	VVLISAMKKKYQKDKTKASENEIKAVNEANLEP	IRGDD-----RVD-RETHI-----
ggOatp1b3	655	ILFFILIKKNMONKNSRLAENGREDVPMNKE	DNCKNGEHLTSPPEAEKESHT-----
OATP1B1	---		
OATP1B3	700	AAN	
mOatp1b2	---		
rOatp1b2	---		
cfOatp1b4	---		
fcOatp1b4	---		
btOatp1b4	---		
equOatp1b4	---		
susOatp1b4	---		
ggOatp1b3	---		

**Abb. 5.1: Aminosäuren-Sequenzalignment der Oatp1b-Proteine verschiedener Spezies**

Das Alignment wurde mit dem *ClustalW* Algorithmus berechnet und mit BOXSHADE 3.21 dargestellt. Aminosäureidentitäten sind schwarz hinterlegt, Aminosäureähnlichkeiten grau schattiert. Zur Optimierung des Alignments sind Lücken (-) eingefügt.

## 5.2 Der canine Oatp1b4-Transporter

### 5.2.1 Screening der Hundeproben auf Polymorphismen im Oatp1b4-Transporter

Besonderes Augenmerk dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des caninen Oatp1b4-Transporters durch Auswertung von Leberbiopsieproben verschiedener Hunderassen unterschiedlichen Alters und beider Geschlechter. Da bei den humanen Lebertransportern OATP1B1 und OATP1B3 inzwischen sehr viele Polymorphismen bekannt sind, von welchen sich auch einige auf die Transporteigenschaften der Membrantransporter auswirken (Tirona et al. 2001; König 2011; Nakanishi und Tamai 2012), war von großem Interesse wie sich die



Situation beim Hund darstellt. Mit 42 Leberproben konnte ein guter Querschnitt durch die Hundepopulation erreicht werden. Die für diese Studie definierten Qualitätsstandards ließen jedoch nur die Untersuchung von 30 der insgesamt 42 Leberbiopsien zu. Die meisten Leberproben wurden im Rahmen von diagnostisch durchgeführten Laparotomien entnommen. Einige Proben jedoch stammten auch von Feinnadelaspirationen. Hier stand oftmals eine unzureichende Menge des Lebermaterials zur Verfügung, sodass die RNA nach Isolierung nicht den erforderlichen Qualitätsstandards entsprach (siehe Kapitel 4.1.2.1). Auch bei der Aufarbeitung der anderen Proben war es in einigen Fällen nicht möglich, eine ausreichend gute Qualität der isolierten RNA/cDNA zu erzielen. Inwiefern dies mit der Grunderkrankung der Tiere zusammenhing, ließ sich nicht eindeutig ermitteln. Es kann jedoch vermutet werden, dass Lebererkrankungen, wie z.B. Leberzirrhose, Fettleber oder Leberfibrose, die Aufarbeitung von RNA nach dem verwendeten Standardprotokoll negativ beeinflussen können. Um diese Einflussfaktoren weitestgehend ausschließen zu können, müsste auf eine Hundepopulation zurückgegriffen werden, die einen gleich guten Gesundheitsstatus aufweist, oder das RNA-Isolationsprotokoll müsste den pathologischen Veränderungen angepasst werden. Im Gegenzug hatte diese Art der Probengewinnung aber auch den Vorteil einen Querschnitt durch ein reales Patientenkollektiv zu liefern, was bei einer kontrollierten Studie so nicht möglich gewesen wäre. Darüber hinaus hat die Verwendung von diagnostischem Restmaterial erübrigt, dass im Rahmen eines genehmigungspflichtigen Tierversuchsvorhaben zusätzlich für diese Studie Leberbiopsien genommen werden müssen.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Vergleich zu der Referenzsequenz, welche aus der Leber eines Beagles ermittelt wurde (Gui und Hagenbuch 2010), lediglich ein polymorpher Haplotyp identifiziert werden. Bei diesem wird sowohl an Position 693 als auch an Position 1186 Adenin durch Guanin ersetzt (693 A>G und 1186 A>G). Dies führt im Falle des SNPs an Position 1186 zu einem Austausch der Aminosäure Isoleucin zu Valin (I396V). 5 der 30 Hunde stellten sich heterozygot für diesen Haplotyp dar, 15 Hunde waren homozygot. Dieser Befund wurde so nicht erwartet und kann daher als überraschend bewertet werden. So wurde aufgrund der zahlreichen Polymorphismen bei OATP1B1 und OATP1B3 und der Ähnlichkeit der Transporter zueinander eigentlich angenommen, dass auch im caninen Oatp1b4-Transporter mehrere Polymorphismen zu finden sein sollten. Bislang konnten im OATP1B1 des Menschen 44 verschiedene SNPs gefunden werden, wobei nicht alle zu einer geänderten Transportaktivität des Transporters führen (Tirona et al. 2001). Insgesamt

werden 21 verschiedene Haplotypen unterschieden, bei welchen einige SNPs alleine oder auch in Kombination auftreten. So ist bei OATP1B1\*4 lediglich der Polymorphismus 463 C>A vorhanden. Dieser führt jedoch zu einem Ausfall der Transportfunktion für Taurocholat (Michalski et al. 2002). In OATP1B1\*18 sind insgesamt 3 SNPs vorhanden (388 A>G, 463 C>A und 578 T>G). Dieser Haplotyp führt zu einer stark reduzierten Lokalisation des OATP1B1 in der Plasmamembran und damit zu einem Transportverlust für BSP, E<sub>2</sub>17G und TC (Michalski et al. 2002). Für OATP1B3 sind bislang 14 Polymorphismen beschrieben (Schwarz et al. 2011). Nicht alle davon wurden jedoch auch funktionell überprüft. Aufgrund dieser Datenlage zu OATP1B1/1B3 war es erstaunlich, dass im Rahmen dieser Arbeit nur ein einziger polymorpher Haplotyp (693 A>G und 1186 A>G) im cfOatp1b4 gefunden werden konnte. Beim OATP1B1 gibt es darüber hinaus ein populationsabhängig unterschiedliches Auftreten bestimmter Polymorphismen (Tirona et al. 2001; Michalski et al. 2002; Nozawa et al. 2002). So untersuchten Pasanen et al. die globale Verteilung der Haplotypen OATP1B1\*1a, \*1b (388 A>G), \*5 (521 T>C) und \*15 (388 A>G, 521 T>C) in Afrika, Mittlerem Osten, Asien, Europa, Ozeanien und bei nordamerikanischen Ureinwohnern. Hierbei zeigte sich, dass OATP1B1\*1b vermehrt in Ozeanien (66%) und im südlichen Afrika (77%) vorkommt, OATP1B1\*5 und \*15 jedoch kaum. Die Verteilung dieser Haplotypen scheint in Korrelation zu der Ausbreitung des *Homo sapiens* aus Afrika heraus zu stehen (Pasanen et al. 2008). In Anbetracht der vielen verschiedenen untersuchten Hunderassen war auf Grundlage dieser Daten daher erwartet worden, dass es ggf. zu einer rasseabhängigen Häufung bestimmter Polymorphismen beim Hund kommen würde. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Dass die geringe Polymorphismenzahl nicht an der Auswahl der zur Verfügung stehenden Proben liegt und somit eine gute Übersicht auf die Situation in der Hundepopulation gibt, zeigt eine frühere Studie, welche mit demselben Probematerial gearbeitet hat. Hier wurden Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen der Leber untersucht und es wurde eine überraschend große Vielzahl an Polymorphismen gefunden (Prinzinger 2015). Als besonders polymorph stellte sich hierbei CYP2D15 dar. Neben einer *in frame* Deletion des Exon 3 konnten zehn verschiedene Haplotypen definiert werden.

### **5.2.2 Expression des caninen Oatp1b4**

Gui und Hagenbuch untersuchten 2010 mittels *Northern Blot* Analyse die Expression des caninen Oatp1b4 in verschiedenen Geweben. Eine deutliche mRNA-Expression konnte in der

Leber detektiert werden. Eine sehr schwache Bande konnte auch in der Niere dargestellt werden. In allen anderen aufgeführten Geweben war kein Signal zu erkennen (Gui und Hagenbuch 2010). Aufgrund dieser bereits vorhandenen Daten wurde bei der vorliegenden Arbeit auf ein Organprofil des cfOatp1b4 verzichtet. Durch die große Probenzahl verschiedener Hunde konnte jedoch eine vergleichende Analyse der mRNA-Expression in der Leber mittels *Real-Time PCR* durchgeführt werden. Leider konnten auch hier nicht alle Leberbiopsien mit in den Versuchsaufbau aufgenommen werden, da die erforderliche RNA-Qualität, repräsentiert durch den RIN-Wert, teilweise nicht gegeben war. Die Auswertung der *Real-Time PCR* von 26 Proben mit RIN-Werten  $> 7,3$  ergab eine relativ konstante Expression des cfOatp1b4 in Relation zu den ausgewählten Kontrollgenen ACTB und B<sub>2</sub>M. Durch die Angabe des  $\Delta C_t$ -Wertes werden unterschiedliche Gewebeeffekte ausgeglichen. Ein durchschnittlicher  $\Delta C_t$ -Wert von 4,1 (ACTB) und 4,9 (B<sub>2</sub>M) sprach für eine gute relative Expression des Oatp1b4 in der Leber verschiedener Hunde. Die Streuung zwischen den einzelnen Hunden war gering. Bei den gegen ACTB normalisierten Werten unterschied sich die relative Expression zwischen dem Hund mit dem niedrigsten und dem höchsten  $\Delta C_t$ -Wert um das 18-fache, bei den gegen B<sub>2</sub>M normalisierten Werten um das 28,8-fache. Dies wurde, wie in Abb. 4.6 zu sehen ist, durch einige wenige Ausreißer verursacht. Insgesamt ist die Expression des cfOatp1b4 in der Hundeleber daher als sehr konstant hoch und innerhalb der untersuchten Hundepopulation als gleichmäßig verteilt anzusehen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der relativen Expression und den unterschiedlichen cfOatp1b4-Varianten festgestellt werden. Der I396V Polymorphismus scheint also auf die mRNA-Expression keinen Einfluss zu haben. Die vereinzelt aufgetretenen größeren Abweichungen in der Expression können, wie bereits in Kapitel 5.2.1 angesprochen, pathologisch verändertem Lebergewebe geschuldet sein. So lagen klinische Daten der Hunde über z.B. Hepatopathien, Leberzirrhosen, multifokale Leberzelldegeneration oder auch Metastasierung in der Leber vor. Jedoch zeigte sich in der bereits oben erwähnten Studie zu Cytochrom-P450-Enzymen in der Hundeleber eine weitaus größere Streuung der Expression der untersuchten Gene, trotz des gleichen verwendeten Probenmaterials (Prinzinger 2015). Dies bestätigt einmal mehr die konstante, gute Expression des cfOatp1b4 in der Leber des Hundes. Jung et al. konnten 2001 zeigen, dass die Expression von OATP1B1 und OATP1B3 durch HNF1 $\alpha$  (*hepatic nuclear factor 1 $\alpha$* ) reguliert wird. In den folgenden Jahren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Reihe von Einflussfaktoren auf die Expression dieser beiden Transporter gefunden. So führt HNF3 $\beta$ , welches vermehrt in Leberzellkarzinomen

gebildet wird, zu einer reduzierten mRNA-Expression von OATP1B3, wohingegen es keinen Einfluss auf die Expression des OATP1B1 zu haben scheint (Vavricka et al. 2004). HGF (*hepatocyte growth factor*) hingegen führt zu einer verminderten mRNA Expression des OATP1B1. Die OATP1B3 Expression scheint von HGF jedoch nicht beeinflusst zu werden (Le et al. 2009). Ob es beim Hund ähnliche Regulationsmechanismen des cfOatp1b4 gibt ist bislang nicht untersucht, könnte jedoch den einen oder anderen Ausreißer bei den Ergebnissen der *Real-Time PCR*, bei der ansonsten recht konstanten Expression erklären.

### 5.2.3 Funktionelle Charakterisierung der cfOatp1b4-Varianten

Als nächstes sollte eine funktionelle Untersuchung der gefundenen cfOatp1b4-Varianten erfolgen. Die Grundlage hierfür stellte ebenfalls die Studie von Gui und Hagenbuch (2010). In dieser wurde der cfOatp1b4 transient in HEK293 Zellen transfiziert und mit diesen Zellen Aufnahmeversuche mit verschiedenen OATP1B1/1B3-Substraten durchgeführt. Dabei konnte ein Transport für TC, E<sub>2</sub>17G, E<sub>1</sub>S, BSP, CCK8 und Docetaxel gezeigt werden (Gui und Hagenbuch 2010).

Daher wurde zu Beginn dieser Arbeit ebenfalls eine transiente Transfektion der beiden caninen Oatp1b4-Varianten durchgeführt, wobei *Lipofectamine 2000 Reagent* (Life Technologies) als Transfektionsreagenz verwendet wurde. Hierbei entstehen durch elektrostatische Anziehung Komplexe zwischen der negativ geladenen Nukleinsäure und dem positiv geladenen synthetischen Lipid-Reagenz. Diese Komplexe können dann mittels Endozytose in die Zellen aufgenommen werden und bis zum Zellkern vordringen, wo die DNA abgelesen werden kann (Chesnoy und Huang 2000; Hirko et al. 2003). Der zunächst verwendete Zelltyp für die transiente Transfektion waren GripTite 293 MSR-Zellen, welche in zahlreichen früheren Studien an unserem Institut gute, reproduzierbare Ergebnisse lieferten (siehe z.B. Döring 2009; Bakhaus 2014). GripTite 293 MSR-Zellen unterscheiden sich lediglich im *macrophage scavenger receptor* von der HEK293-Zelllinie (Cheung et al. 1996; Robbins und Horlick 1998). Dieser Rezeptor vermittelt eine bessere Haftung an glatten Oberflächen und führt somit bei Studien, die häufige Waschschrte erfordern, zu einem geringeren Verlust an Zellen während des Experiments. Somit ist eine bessere Aussagekraft der Experimente zu erwarten.

Erste Messungen zeigten einen signifikanten Transport für TC, BSP und E<sub>1</sub>S durch die mitgeführte Positivkontrolle, Oatp1b2 der Ratte, jedoch zunächst keinen Transport für cfOatp1b4-WT und cfOatp1b4\* (siehe Kapitel 4.1.3.1). Eine mögliche Ursache hierfür könnte

eine verminderte Proteinsynthese des caninen cfOatp1b4 in einer humanen Zelllinie sein, verursacht durch ein unterschiedliches *codon usage* zwischen Hund (transfizierter Klon) und Mensch (Zelllinie). *Codon usage* bezeichnet dabei den unterschiedlichen Codongebrauch von verschiedenen Spezies. Hierbei werden ausgewählte Codons bevorzugt verwendet. Dies wird durch die entsprechende Menge an tRNA reguliert, sodass ein niedriger Gehalt eines Codons die Translation verlangsamt oder sogar zum Stoppen bringt (Rocha 2004; Hershberg und Petrov 2008; Plotkin und Kudla 2011). Dies ist bei der Transfektion zu berücksichtigen, wenn der Organismus des Expressionsmodells nicht mit dem Organismus des zu untersuchenden Gens übereinstimmt. Durch die Verwendung von MDCK-Zellen, also caninen Nierenzellen, wurde versucht diesem Problem zu begegnen, indem nun transfizierter Klon und Zelllinie aus der gleichen Spezies stammten. Um den möglichen Einfluss gewebespezifischer Faktoren auf die Proteinexpression ebenfalls zu berücksichtigen, wurden auch Transfektionsexperimente in der Leberzelllinie HepG2 durchgeführt. Wie in Abb. 4.8 abgebildet ist, konnte aber auch bei Verwendung dieser Zellsysteme keine Aufnahme durch die cfOatp1b4-Transporter gezeigt werden, sodass angenommen werden kann, dass die Auswahl des Zelltyps keinen Einfluss auf die Aktivität des Transportproteins hat. Ein weiterer Faktor, der bei den HepG2-Zellen eine Rolle spielen könnte, ist die Tatsache, dass es sich um Leberkarzinomzellen handelt, die aufgrund der karzinomatösen Veränderung ein anderes Protein-, Enzym- und Stoffspektrum aufweisen wie unveränderte Leberzellen und somit die Transporteigenschaften des Zielproteins in diesen Zellen nicht darstellbar sind (Aden et al. 1979; Knowles et al. 1980). Dass der Zelltyp als solches generell für heterologe Expression keine ausschlaggebende Rolle spielen sollte, zeigen aber eine ganze Reihe erfolgreicher Experimente aus anderen und der eigenen Gruppe, in welchen sehr häufig transfizierter Klon und Ziel-Zelllinie nicht der gleichen Spezies entstammen. Zum Beispiel wurden funktionelle Studien zu OATP1B1 erfolgreich mit HEK293-Zellen durchgeführt (siehe z.B. König et al. 2000a; Cui et al. 2001; Hirano et al. 2004), aber auch mit MDCK-Zellen (Sasaki et al. 2002; Shitara et al. 2003), CHO-Zellen (Noe et al. 2007; Treiber et al. 2007; Pacyniak et al. 2010), HeLa-Zellen (Tirona et al. 2003; Ho et al. 2006) und HepG2-Zellen (Yamaguchi et al. 2006). Auch für Studien zu OATP1B3 wurden HEK293-, MDCK- (Letscher et al. 2004) und HeLa-Zellen (Schwarz et al. 2011) eingesetzt.

Neben verschiedenen Zelltypen wurde auch ein weiteres Transfektionsreagenz verwendet. Das *FuGENE HD Transfection Reagent* (Promega) ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, welches eine hohe Effizienz bei verschiedenen Zelllinien und eine

geringe Toxizität aufweist (Jacobsen et al. 2006). Die positiv geladene Mizellen-Struktur reagiert mit der negativ geladenen Phosphatgruppe der DNA. Diese immer noch leicht positiv geladenen Komplexe lagern sich der negativ geladenen Zellmembran an und werden durch Endozytose aufgenommen. Mit *FuGENE HD* transient transfizierte GripTite 293 MSR-Zellen wiesen jedoch eine geringere Transportleistung v.a. von der Positivkontrolle rOatp1b2 im Vergleich zu den mit *Lipofectamine 2000* transfizierten Zellen auf. Bei beiden Transfektionsreagenzien wurde nach den Protokollangaben der Hersteller verfahren. Eine Transfektion ist jedoch eine komplexe Prozedur auf die viele Faktoren Einfluss haben können. So ist die Qualität der eingesetzten Plasmid-DNA von Bedeutung, die jedoch in der vorliegenden Arbeit durch  $A_{260}/A_{280}$ -Quotienten von über 1,8 in der photometrischen Überprüfung stets gegeben war. Ebenso kann sich eine zu niedrige, als auch eine zu hohe Dichte der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion negativ auswirken. Eine zu niedrige Dichte führt durch fehlende Zell-Zell-Kontakte zu einer Instabilität des Zellrasens während der zahlreichen Manipulationsschritte. Da von den Zellen selbst auch Wachstumsfaktoren ausgeschüttet werden, welche benachbarte Zellen beeinflussen, ist dieser Einfluss auf das Zellwachstum bei einer niedrigen Zelldichte ebenfalls nicht gegeben. Bei einer zu hohen Dichte werden dagegen nicht alle Zellen gleichmäßig vom Transfektionsreagenz erreicht und die Versorgung der einzelnen Zellen ist bei einem Überwachsen nicht gegeben, sodass die Zellen ggf. nicht mehr vital genug sind und durch die zusätzliche Belastung der Transfektion dem Zelltod zugeführt werden. Daher wurde bei allen Versuchen darauf geachtet, dass die Zellen zu 60-80 % konfluent waren. Um eine gute Plasmid-Transfektionsreagenz-Komplexbildung zu erzielen ist die Wahl des Mediums von besonderer Bedeutung. So sollten z.B. keine Antibiotika, kein Heparin und keine Wachstumsfaktoren enthalten sein. Durch Verwendung von *OptiMem 1* (Life Technologies) waren diese Voraussetzungen gegeben. Ebenfalls wurde genug Inkubationszeit zur Komplexbildung eingeräumt. Bezüglich des Verhältnisses zwischen eingesetzter Plasmid-DNA und dem entsprechenden Transfektionsreagenz räumen die Hersteller einen gewissen Spielraum ein. Hier wurde im vorliegenden Fall auf Erfahrungswerte aus zahlreichen vorausgegangenen Versuchsansätzen am Institut zurückgegriffen. Da bei Verwendung des *FuGENE HD* Transfektionsreagenz auch die Transportrate der Positivkontrolle rOatp1b2 deutlich hinter den Erwartungen zurückblieb, hätte man hier in weiteren Versuchen das Plasmid-Transfektionsreagenz-Verhältnis variieren können. Da jedoch bei Verwendung von *Lipofectamine 2000* eine gute Aufnahmeleistung des rOatp1b2 gemessen werden konnte, wurde auf weitere Versuche mit

*FuGENE HD* verzichtet und stattdessen im weiteren Verlauf der Studie mit *Lipofectamine 2000* gearbeitet.

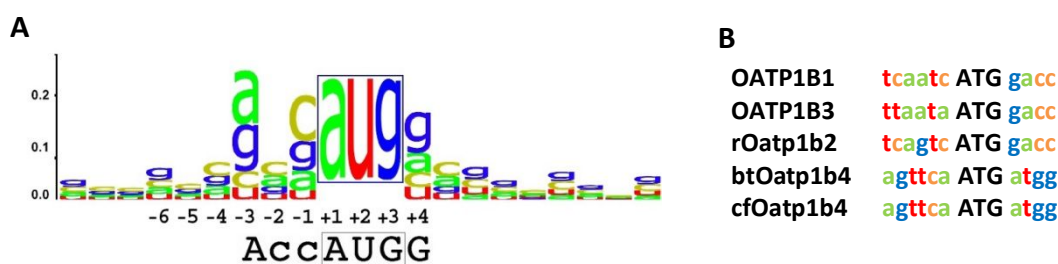
Um zu untersuchen, ob die schlechten Ergebnisse der Transportmessungen mit der Expression und dem *Sorting*, also dem „Sortieren“ der Proteine in die Zellmembran, in den transient transfizierten Zellen in Zusammenhang stehen, wurden *Western Blot* und Immunfluoreszenz Versuche durchgeführt. Da kommerziell kein gegen cfOatp1b4 gerichteter Antikörper erhältlich war, wurde auf einen etablierten gegen das V5-tag gerichteten Antikörper zurückgegriffen (*Maus anti-V5*, Invitrogen). Antikörper gegen OATP1B1 und OATP1B3 sind zwar erhältlich, doch trotz ihrer nahen Verwandtschaft können diese Antikörper laut Angaben des Herstellers explizit nicht zum Nachweis des caninen Oatp1b4 eingesetzt werden (Thermo Fisher, Data sheet OATP2-AB).

Der Nachweis, der mit dem V5-His-tag markierten Proteine erfolgte mittels *Maus anti-V5 Antikörper* (Invitrogen), welcher durch den fluoreszenz-markierten Antikörper *Ziege Alexa Fluor 488 anti-Maus* (Invitrogen) visualisiert werden konnte. Bei der in transient transfizierten GripTite MSR 293 Zellen durchgeführten Immunfluoreszenz konnte generell nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal für cfOatp1b4 detektiert werden, was auf eine verminderte Proteinsyntheserate hindeutet. Jedoch könnte auch ein vermindertes *Sorting* in die Zellmembran zu einer Verminderung der Transportleistung führen. Dies konnte für den Einzelbasenaustausch 193 L>R des OATP1B1 gezeigt werden, für den als Folge des gestörten Membransortings ein vollständiger Funktionsverlust festgestellt wurde (Michalski et al. 2002). Im vorliegenden Fall deutete die generell geringe Immunfluoreszenz aber eher auf ein Proteinsyntheseproblem als auf ein Sortingproblem hin. Die *Western Blot* Analyse bestätigt dieses Bild durch eine im Vergleich zu rOatp1b2 und btOatp1b4 sehr schwache Bande bei Verwendung der gleichen Proteinmenge, die durch Verwendung des anti-GAPDH Antikörpers und der Proteinmengenbestimmung mittels *BCA-Assay* kontrolliert werden konnte.

Mögliche Ursachen für diese unzureichende Proteinexpression des cfOatp1b4-Proteins sind zum einen das bereits beschriebene *codon usage*, welches aber durch die zuvor aufgeführten Experimente weitestgehend ausgeschlossen werden konnte. Einen weiteren Einflussfaktor auf die Proteinbiosynthese hat die sogenannte *Kozak-Sequenz*. Darunter versteht man die Nukleinbasensequenz der mRNA in unmittelbarer Umgebung des Startcodons. Hierbei gibt es eine Häufung bestimmter Basenabfolgen. Abweichungen davon können die Proteinbiosynthese beeinflussen (Kozak 1986, 1987).



Ein Vergleich der Sequenzen von OATP1B1, OATP1B3, rOatp1b2, btOatp1b4 und cfOatp1b4 ergab zwar einige Abweichung zu der „idealen“ Basenabfolge der *Kozak*-Sequenz, doch im Vergleich untereinander war v.a. zwischen Rind und Hund eine 100 %-ige Übereinstimmung vorzufinden. Während aber btOatp1b4 eine gute Transfektionsrate in Immunfluoreszenz und *Western Blot* zeigte und ein eindeutiger Transport in den funktionellen Experimenten darstellbar war, ist die Sequenz um das Startcodon wahrscheinlich nicht der Grund für die geringe Proteinsyntheserate des cfOatp1b4. Dennoch könnte man durch Mutation der Basen hin zur optimalen *Kozak*-Sequenz versuchen eine bessere Proteinexpression zu erreichen. Dieser Versuch wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht unternommen.



**Abb. 5.2 Darstellung der *Kozak*-Sequenz und die Sequenzabfolge einiger OATP1B/Oatp1b-Transporter.**

**A** zeigt die Basenabfolge der *Kozak*-Sequenz. Die Größe der Base zeigt ihre Häufigkeit an der entsprechenden Stelle. Mittig ist das Startcodon (AUG) abgebildet. (Abbildung aus <https://de.wikipedia.org/wiki/Kozak-Sequenz>)

**B** zeigt die Basenabfolge in unmittelbarer Umgebung des Startcodons bei OATP1B1 und 1B3 des Menschen, sowie bei rOatp1b2 (Ratte), cfOatp1b4 (Hund) und btOatp1b4 (Rind). In Großbuchstaben ist das Startcodon (ATG) der cDNA abgebildet.

Da der Transport von cfOatp1b4 also im Zellkulturmodell nicht eindeutig zu messen war, wurde als weiteres Expressionsmodell *Xenopus laevis* Oozyten verwendet. Bereits die ersten Transportstudien mit OATP1B1 und OATP1B3 wurden erfolgreich mit *X. laevis* Oozyten durchgeführt (siehe z.B. Abe et al. 1999; Kullak-Ublick et al. 2001). Somit hatte sich dieses Expressionsmodell bereits bei der Untersuchung der vergleichbaren humanen Transporter bewährt. Zum anderen wurde an unserem Institut für einige Projekte ebenfalls mit diesem Expressionsmodell gearbeitet, sodass die nötigen Gerätschaften und die Fachkenntnis für die Durchführung solcher Versuche gegeben waren (Geyer et al. 2004; Schmidt et al. 2015). Gerade bei der funktionellen Charakterisierung von OATP-Transportern scheint dieses Expressionsmodell der Zellkultur überlegen zu sein. Tatsächlich zeigten schon die ersten Aufnahmeversuche mit E<sub>1</sub>S, BSP, TC, CCK8 und Digoxin einen signifikanten Transport von E<sub>1</sub>S, BSP, TC und Digoxin für beide cfOatp1b4-Varianten. Für CCK8 konnte nur für cfOatp1b4-WT eine Aufnahme dargestellt werden, nicht jedoch für cfOatp1b4\*. Bei dem Vergleich der



cfOatp1b4-Varianten zueinander stellte sich lediglich für BSP und CCK8 ein signifikanter Unterschied in der Aufnahme dieser Substanzen dar. Somit kann angenommen werden, dass der Polymorphismus in cfOatp1b4\* durchaus Auswirkungen auf funktioneller Ebene für einige Substanzen haben kann. Um diese weiter auszuarbeiten, wären Versuche mit weiteren Substanzen und auch klinisch relevanten Pharmaka, wie z.B. Rifampicin, Cefazolin oder Enalapril, zu welchen Daten von OATP1B1 vorliegen, angebracht. Diese Untersuchungen konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert werden. Aufbauend auf den bis dahin erzielten Ergebnissen, wurden aber eine zeitabhängige Aufnahme und auch eine Kinetik-Studie mit BSP durchgeführt. Eine signifikante Aufnahme im Vergleich zu den Kontroll-Oozyten konnte für cfOatp1b4-WT ab 90 min und für cfOatp1b4\* ab 60 min dargestellt werden. Bei den nachfolgenden Kinetik-Studien konnte jedoch kein reproduzierbares Ergebnis generiert werden, sodass hier keine Auswertung erfolgen konnte. Über einen mehrere Wochen andauernden Zeitraum hinweg, wiesen die Oozyten selbst eine sehr schlechte Qualität auf. Dies äußerte sich in einer Häufung früher Oozytenstadien, einer hohen Sterblichkeit und einem sehr geringen Turgor der Oozyten, sodass es schwierig war eine ausreichende Anzahl an Oozyten für die entsprechenden Versuche auszusortieren und auch diese die Expressionszeit von der Injektion der cRNA bis zum Start des Versuchs größtenteils nicht überstanden. Es stellte sich heraus, dass die *X. laevis* Frösche mit einer Mykobakterium-Spezies infiziert waren (persönliche Mitteilung von Dr. Katrin Richter, Institut für Tierphysiologie, JLU Gießen). Die Infektion verlief jedoch über einen längeren Zeitraum hinweg latent, wodurch dieses gesundheitliche Problem der Frösche lange unbemerkt blieb. Selbst bei während der Versuchsdurchführung adspektorisch gutaussehenden Oozyten, stellte sich nach der Auswertung heraus, dass die als Negativkontrolle verwendeten, also mit H<sub>2</sub>O-injizierten, Oozyten eine ungewöhnlich hohe Radioaktivität aufwiesen. Es ist davon auszugehen, dass hier die Oozytenmembran ebenfalls nicht mehr intakt war, sodass passiv Radioaktivität in die Oozyten gelangen konnte.

Als letzte Möglichkeit ein stabiles, reproduzierbares Expressionsmodell für die cfOatp1b4-Varianten zu entwickeln, erfolgte eine dauerhafte Integration der DNA in die Zellen durch die stabile Transfektion von cfOatp1b4 und cfOatp1b4\* in HEK293-Zellen. Die stabile Transfektion ermöglicht gegenüber der transienten Transfektion höhere Expressionsraten und hat schon in früheren Transportstudien am Institut für Pharmakologie und Toxikologie zu erfolgreicher Charakterisierung von Membrantransportern geführt. Durch das ebenfalls eingebrachte Hygromycin B Resistenz-Gen konnten die Zellklone selektioniert werden, die

das Zielgen auch enthalten (Gritz und Davies 1983; Palmer et al. 1987). Zur Kontrolle der Transfektion wurde eine qPCR durchgeführt. Hier konnte in allen Zellklonen die cfOatp1b4-mRNA-Expression in ähnlicher Ausprägung nachgewiesen werden, wohingegen bei nicht-transfizierten Kontrollzellen keine Expression dargestellt werden konnte. Somit konnte vor den experimentellen Studien davon ausgegangen werden, dass das Zielgen in die Zellen eingebaut wurde und es zu einer detektierbaren Expression der cfOatp1b4-mRNA gekommen ist. In den sich anschließenden Transportstudien ließ sich jedoch keine stabile Aufnahme der ausgewählten Substanzen durch die stabil transfizierten Zellen zeigen. Bei den parallel etablierten rOatp1b2-HEK293-Zellen hingegen konnte in der Regel ein signifikanter Transport dargestellt werden (siehe Kapitel 4.1.5.1). Somit kann einerseits ein methodischer Fehler bei der Durchführung der stabilen Transfektion ausgeschlossen und andererseits das Funktionieren der ausgewählten Methode und des Expressionsmodells bestätigt werden. Im weiteren Verlauf wurde zum einen die eingesetzte Konzentration der Substanzen variiert. So wurde zunächst mit einer Standardkonzentration von 1  $\mu$ M gearbeitet, später versuchsweise jedoch auch mit deutlich niedrigeren Konzentrationen (z.B. 28 nM BSP, 4 nM CCK8, 7 nM E<sub>1</sub>S) gearbeitet. Hierbei zeigte sich, dass für rOatp1b2 als Positivkontrolle in dem Bereich der niedrigeren Konzentrationen ein deutlicher Rückgang der Aufnahme aller Substanzen zu verzeichnen war. Zum anderen wurden Aufnahmemessungen über 1 min, 7 min und auch 60 min durchgeführt, jedoch konnte auch hier bei keiner der gewählten Aufnahmezeiten eine konstante Aufnahme für die stabil transfizierten cfOatp1b4-Zellen beobachtet werden. Zusammenfassend muss aufgeführt werden, dass verschiedene Expressionsmodelle für den cfOatp1b4-Transporter entwickelt wurden, wobei ausschließlich bei Versuchen mit *X. laevis* Oozyten verwertbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Im Zellsystem wurde sowohl mit transient, als auch stabil transfizierten Zellen gearbeitet, wobei das Funktionieren der Methoden durch rOatp1b2 bestätigt werden konnte, für cfOatp1b4 jedoch keine Aufnahme typischer OATP1B1/1B3 Substanzen gezeigt werden konnte. Durch Verwendung verschiedener Zelltypen, unterschiedlicher Konzentrationen der Messsubstanzen und variierten Aufnahmezeiten wurde versucht die optimalen Versuchsbedingungen auszuwählen, leider ohne Erfolg. Durch *Western Blot* Analyse und Immunfluoreszenz konnte zumindest für die transiente Transfektion gezeigt werden, dass trotz Nachweis auf mRNA-Ebene kaum cfOatp1b4-Protein in den Zellen gebildet wurde, während für das rOatp1b2-Protein sehr hohe Expressionsraten selbst bei transients Transfektion erzielt werden

konnten. Die Ursache hierfür ließ sich in der vorliegenden Studie nicht klären und bedarf weiterer Untersuchungen.

### 5.3 Der bovine Oatp1b4-Transporter

Die Identifizierung und Erstklonierung des bovinen Oatp1b4 aus der Rinderleber erfolgte bereits im Rahmen einer Diplomarbeit durch Dr. B. Döring am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Döring 2003). Es folgten funktionelle Messungen mit *X. laevis* Oozyten. In der vorliegenden Studie sollte durch Verwendung von HEK293-Zellen ein weiteres Expressionssystem für den btOatp1b4 etabliert werden. Der Vorteil des Zellkultursystems gegenüber den *X. laevis* Oozyten besteht in der deutlich einfacheren Handhabung, sowohl bei der Integration des Zielgens, als auch bei den Aufnahmestudien selbst. Für die transiente Transfektion in HEK293-Zellen benötigt man kaum mehr als 2 h, während für die mRNA-Injektion in die *X. laevis* Oozyten einer vergleichbaren Studie an die 6 h für die Injektion der cRNA in die Oozyten angesetzt werden müssen. Auch der Versuchsaufbau selbst ist für die Oozyten wesentlich aufwendiger, da diese vor der Messung vereinzelt werden müssen. Darüber hinaus ist das Handling der Oozyten während des Versuchsablaufs ungleich filigraner und das System daher anfälliger.

*Western Blot* und Immunfluoreszenz mit transient transfizierten btOatp1b4-HEK293-Zellen wurden durchgeführt, um die Transfektionsrate und die Proteinexpression zu überprüfen. Mit Hilfe des *Maus anti-V5 Antikörpers* (Invitrogen) konnte eine deutliche Expression des Proteins in der Zellmembran dargestellt werden (Abb. 4.20). In der *Western Blot* Analyse wurde bestätigt, dass große Mengen btOatp1b4-Gesamtprotein in den Zellen vorhanden ist (Abb. 4.21). Somit waren eine gute Transfektionsrate und ein gerichtetes *Sorting* des Proteins in die Zellmembran gegeben. Dies waren wichtige Voraussetzungen für die anschließende funktionelle Charakterisierung.

Bei den zunächst durchgeführten Transportstudien sollte auch eine vergleichende Darstellung zu den humanen Transportern OATP1B1 und OATP1B3 stattfinden. Daher wurden die OATP-Modellsubstrate BSP, E<sub>1</sub>S und TC, sowie das OATP1B3-spezifische CCK8 gewählt. Für BSP und E<sub>1</sub>S konnte ein signifikanter Transport gezeigt werden, nicht jedoch für TC. Ebenfalls konnte auch erstmals gezeigt werden, dass CCK8 von dem bovinen Oatp1b4 transportiert wird, wenn auch nicht in der gleichen Ausprägung wie von OATP1B3 (Abb. 4.22). Damit vereinigt der bovine Oatp1b4 bei der hier gewählten Auswahl an

Substraten Eigenschaften sowohl des OATP1B1, also auch des OATP1B3. Um weitere Aufschlüsse über die funktionellen Übereinstimmungen, als auch Unterschiede des btOatp1b4 zu OATP1B1 und OATP1B3 auszuarbeiten, müssten weitere Substanzen herangezogen werden. So könnten z.B. Digoxin, Paclitaxel und Ouabain als OATP1B3-spezifische Substanzen gewählt werden und Leukotrien C4 als Substrat, welches von OATP1B1 aber nicht von OATP1B3 transportiert wird (Abe et al. 1999; Hsiang et al. 1999; Kullak-Ublick et al. 2001). Döring führte 2003 bereits Messungen mit Oubain, Digoxin und Leukotrien C4 an *X. laevis* Oozyten durch. Hierbei konnte der Nachweis eines Transports von Ouabain und Digoxin nicht erbracht werden. Für Leukotrien C4 hingegen war bereits bei einer geringen Konzentration von 7,7 nM eine Aufnahme zu registrieren (Döring 2003).

Für Kinetikstudien wurde E<sub>1</sub>S gewählt, da für dieses Substrat eine zuverlässige Aufnahme in den vorrausgegangenen Messungen zu verzeichnen war. Zum anderen lagen hierfür bereits Ergebnisse vor. So wurde ein K<sub>m</sub>-Wert von 31,8 µM und V<sub>max</sub> = 1608 fmol/Oozyte x 20 min bestimmt (Döring 2003). Durch Verwendung der transient transfizierten HEK293-Zellen sollte ein Vergleich zu diesen an *X. laevis* Oozyten bestimmten Ergebnissen gezogen werden. Dabei wurde ein V<sub>max</sub>-Wert von 231,6 ± 30,6 pmol/mg Protein/min und ein K<sub>m</sub>-Wert von 9,5 ± 6,8 µM über nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten bestimmt. Der Hintergrund dieser unterschiedlichen Werte bedarf der weiteren Untersuchung insbesondere durch wiederholte vergleichende Transportmessungen in beiden Expressionssystemen, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht realisiert werden konnte.

## 5.4 Die Oatp1b-Transporter weiterer Tierarten

Neben Oatp1b4 von Hund und Rind wurden die Oatp1b-Transporter von Schwein, Pferd, Katze, Maus und Huhn aus Leberproben isoliert und kloniert. Für Schwein, Pferd und Katze stellten diese Experimente die Erstklonierung dar, da die Oatp-Carrier der Oatp1b-Subfamilie bei diesen Spezies zuvor noch nicht untersucht wurden. Nach Generierung der jeweiligen PCR-Produkte konnte in mehreren Versuchen keine Integration des Oatp1b3 des Huhns und des Oatp1b2 der Maus in ein Vektorsystem gelingen. Mit mehr als 2000 bp handelt es sich bei den Oatps um sehr große Konstrukte. Des Öfteren konnte nach erfolgter Klonierung von mOatp1b2 und ggOatp1b3 nur ein Teilstück der Sequenz im Vektorsystem nachgewiesen werden. Hier muss beachtet werden, dass das verwendete Prinzip der TOPO/TA-Klonierung die besten Ergebnisse mit kürzeren Sequenzen erzielt (Invitrogen). Dennoch wurden in

dieser Arbeit die Oatp Sequenzen der anderen Tierarten, welche in etwa die gleiche Basenlänge aufweisen, erfolgreich nach demselben Protokoll kloniert. Damit kann davon ausgegangen werden, dass nicht die Transkriptlänge per se die Ursache für die Probleme des Klonierens von mOatp1b2 und ggOatp1b3 darstellte. Durch die Überprüfung der PCR-Produkte vor dem Klonieren konnte auch sichergestellt werden, dass zu diesem Zeitpunkt die Sequenzen in vollem Umfang vorlagen. Eine auf Ebene der PCR entstandene Mutation, welche sich bei der Klonierung fortgesetzt hätte wurde somit ausgeschlossen. Da sich mOatp1b2 und ggOatp1b3 nicht in die gewünschten Zielvektoren klonieren ließen, standen für weitere Untersuchungen nur die Oatp1b4-Transporter von Schwein, Pferd und Katze zur Verfügung. Hierbei sollte im Zellkultursystem ein funktioneller Vergleich mit OATP1B1/1B3, rOatp1b2, cfOatp1b4 und btOatp1b4 durchgeführt werden und somit Unterschiede und Vergleichbarkeiten auf funktioneller Ebene zwischen den verschiedenen Tierarten herausgearbeitet werden.

Es wurden Immunfluoreszenz und *Western Blot* Analyse der mit Oatp1b4 von Schwein und Pferd transient transfizierte GripTite 293 MSR Zellen durchgeführt. Hierfür wurde derselbe Versuchsaufbau wie zuvor bei den cfOatp1b4-Varianten verwendet. Auch die Ergebnisse waren vergleichbar zu denen der cfOatp1b4-Transporter. Für den Oatp1b4 des Pferdes konnte in der Immunfluoreszenz kaum ein Fluoreszenzsignal ausgemacht werden, weder in der Zellmembran noch im Zytoplasma. Bei den mit Oatp1b4 des Schweines transfizierten Zellen, konnten einige Zellen mit einem deutlichen Fluoreszenzsignal in der Zellmembran ausgemacht werden (siehe Abb. 4.20). Dennoch war die Transfektionsrate in Relation zu der Zellzahl nicht zufriedenstellend. Im *Western Blot* bestätigten die Proteinbanden das Bild aus der Immunfluoreszenz (siehe Abb. 4.21).

Der Oatp1b4-Transporter der Katze wurde lediglich mit intaktem Stopcodon in den *pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO* Vektor integriert. Dadurch konnte der *Maus anti-V5-Antikörper* nicht greifen, sodass hier keine *Western Blot*- und Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

Mit Oatp1b4 von Pferd, Schwein und Katze transient transfizierte GripTite 293 MSR Zellen wurden in Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem BSP, E<sub>1</sub>S, TC und CCK8 eingesetzt. Hierbei konnte bei keinem dieser Transporter eine Aufnahme von E<sub>1</sub>S, CCK8 und TC gezeigt werden. Für BSP jedoch zeigten susOatp1b4 und equOatp1b4 eine Aufnahme mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  (Auswertung mittels *One way ANOVA*). Zusammenfassend mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz und der *Western Blot* Analyse betrachtet, sind diese

Ergebnisse jedoch vorsichtig zu werten, da zu befürchten ist, dass die kaum bis gar nicht vorhandene Aufnahme typischer OATP Substrate der äußerst geringen Transfektionsraten der Oatp1b4-Transporter geschuldet sein könnten. Wenn kaum transfizierte Zellen vorliegen, kann auch keine Aufnahme der Substanzen in die Zellen über die Oatp1b4-Transporter stattfinden. Als Ursachen kommen die bereits in Kapitel 5.2.3 zu dem caninen Oatp1b4 aufgeführten Probleme in Hinsicht auf z.B. das *codon usage* oder auch der *Kozak*-Sequenz in Betracht. Eine endgültige Klärung für die unzureichende Proteinsynthese der hier untersuchten Oatp1b-Transporter verschiedener Tierarten konnte abschließend nicht erbracht werden und benötigt weitere Untersuchungen. Auch wenn zuletzt keine verwertbaren funktionellen Studien vorzuweisen sind, ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen zum ersten Mal die Sequenzen des Oatp1b4 von Pferd, Schwein und Katze aus der Leber dieser Tierarten direkt zu isolieren und somit die Grundlage für weitere Untersuchungen mit diesen wichtigen Lebertransportern zu legen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die *Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATPs) stellen beim Menschen eine Familie von Arzneistofftransportern mit insgesamt 11 Mitgliedern dar, die in verschiedenen Organen exprimiert werden und für die Aufnahme von exogenen und endogenen Substanzen in die entsprechenden Zellen verantwortlich sind. Die humanen OATP1B1- und OATP1B3-Transporter befinden sich nahezu ausschließlich in der Leber und vermitteln an der sinusoidalen Membran der Hepatozyten die Aufnahme von z.B. Billirubin, Gallensäuren, konjugierten Steroiden und Schilddrüsenhormonen aber auch von Arzneistoffen wie Statinen, Antibiotika, Zytostatika und ACE-Hemmern. Inzwischen wurden bei OATP1B1 und OATP1B3 zahlreiche Polymorphismen identifiziert, von denen einige auch von klinischer Relevanz sind. So führen bestimmte *Single Nucleotide Polymorphismen* (SNPs) zu einer verminderten Aufnahme von Statinen in die Hepatozyten, was beim Menschen eine Statin induzierten Myopathie hervorrufen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal Leberbiopsieproben aus einem größeren Patientenkollektiv von Hunden nach Polymorphismen in dem entsprechenden Transporter des Hundes (cfOatp1b4) hin untersucht. Neben der bereits zuvor beschriebenen cfOatp1b4 cDNA-Sequenz konnte lediglich eine neue polymorphe Variante (693 A>G & 1186 A>G) des cfOatp1b4 isoliert werden. Bei einigen Tieren wurde dieser Haplotyp auch heterozygot nachgewiesen. Damit stellte sich der cfOatp1b4, anders als erwartet, nicht so polymorph dar wie die Lebertransporter OATP1B1 und OATP1B3 des Menschen. Unterschiede in der Expression des cfOatp1b4 in der Leber des Hundes wurden mit der *Real-time* PCR untersucht. Hierbei zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Hunden, ebenso wenig zwischen den beiden cfOatp1b4-Varianten, sodass die Expression des cfOatp1b4 als konstant hoch angesehen werden kann und der gefundene polymorphe Haplotyp keine Auswirkung auf die mRNA-Expression des cfOatp1b4 zu haben scheint. Die funktionelle Charakterisierung der gefundenen cfOatp1b4-Varianten stellte sich im Zellkulturmodell trotz verschiedener Versuchsansätze als problematisch dar. Durch Immunfluoreszenz und *Western Blot* konnte gezeigt werden, dass dies auf eine unzureichende Proteinsyntheserate zurückzuführen ist. Die Ursache hierfür ließ sich in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht klären.

Aus diesem Grund wurden als weiteres Expressionsmodell *Xenopus laevis* Oozyten verwendet. Hierbei zeigten beide cfOatp1b4-Varianten eine Aufnahme von BSP, E<sub>1</sub>S und TC,

wobei die BSP-Aufnahme der polymorphen Variante signifikant höher war, als die des Wildtyps. Für CCK8 konnte lediglich für den Oatp1b4-Wildtyp ein Transport nachgewiesen werden, nicht jedoch für Oatp1b4\*. Ebenfalls zeigten beide Oatp1b4-Varianten eine Aufnahme des Herzglykosids Digoxin.

Neben den ausführlichen Untersuchungen des caninen Oatp1b4 Transporters erfolgte auch die Erstklonierung der Oatp1b4-Transporter von Katze, Pferd und Schwein. Des Weiteren wurde für den bovinen Oatp1b4 Transporter das Zellkultursystem als weiteres Expressionsmodell zur Untersuchung seiner Funktionalität etabliert. Bei der vergleichenden Darstellung zu den humanen Transportern OATP1B1 und OATP1B3 konnte an ausgewählten Modellsubstraten gezeigt werden, dass der bovine Oatp1b4 Transporteigenschaften beider humaner Transporter vereinigt.



## 7 SUMMARY

The organic anion transporting polypeptides (OATPs) are a family of transporters which mediate the uptake of different kind of substrates into cells. The liver specific transporters OATP1B1 and OATP1B3 mediate the uptake of endogenous substrates like bile acids, thyroid hormones or eicosanoids as well as drugs like antibiotics, anticancer drugs or statins into hepatocytes. Many sequence variants were found in the past especially for OATP1B1. Some of these single nucleotide polymorphisms (SNPs) result in modified transport activity which can be important for medical therapies with some drugs like statins.

The aim of this current study was to have a closer look on the canine Oatp1b4 transporter. Many samples of canine liver tissue were collected in cooperation with the veterinarian clinic at Justus-Liebig-University Giessen and were searched for polymorphisms in the sequence of Oatp1b4. Besides the already known variant we could find a polymorphic variant with two SNPs (693 A>G & 1186 A>G). Some of the dogs were heterozygous others were homozygous for this haplotyp. So the canine Oatp1b4 transporter wasn't that polymorphic as it was suspected before. The expression of Oatp1b4-mRNA in liver was measured by real time PCR and showed low variation between the dogs as well as between the two Oatp1b4 variants. So we can state that the SNPs found in canine Oatp1b4 have no effect on the mRNA expression level.

Functional characterization of both canine Oatp1b4 variants was first performed in cell culture. But despite different types of experimental setups no reliable data could be achieved. Western blot analysis and immunofluorescent microscopy revealed low rates of protein synthesis only for the cfOatp1b4, but not for rat Oatp1b2 for unknown reason. So we decided to use *Xenopus laevis* oocytes as additional expression system. Uptake experiments showed transport of BSP, E<sub>1</sub>S and TC. The uptake of BSP of the polymorphic cfOatp1b4 variant was significantly higher compared to cfOatp1b4 wildtype. CCK8 was only transported by cfOatp1b4 wildtype but not by the polymorphic variant. Both variants also showed an uptake of digoxin.

Furthermore we were the first to clone the Oatp1b4 transporters of cat, horse and pig out of liver tissues and established a cell system as expression model for bovine Oatp1b4. Experiments with bovine Oatp1b4 showed overlapping transport activity with OATP1B1 as well as OATP1B3 while using model substrates for these transporters.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Yawo H (1999) Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 274:17159-17163

Adachi H, Suzuki T, Abe M, Asano N, Mizutamari H, Tanemoto M, Nishio T, Onogawa T, Toyohara T, Kasai S, Satoh F, Suzuki M, Tokui T, Unno M, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T (2003) Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F1188-F1197

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282:615-616

Agarwal S, Sane R, Ohlfest JR, Elmquist WF (2011) The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 336:223-233

Bakhaus K (2015) Membrantransporter für sulfatierte Steroidhormone im Hoden: Die Bedeutung des Natrium-dependent Organic Anion Transporter (SOAT) im Reproduktionsgeschehen. Dissertationsschrift am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Lauferweiler Verlag, Gießen ISBN:978-3-8359-6278-1

Ballatori N (2005) Biology of a novel organic solute and steroid transporter, OSTalpha-OSTbeta. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:689-698

Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS, Li N (2005) OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* 42:1270-1279

Ballatori N, Christian WV, Wheeler SG, Hammond CL (2013) The heteromeric organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta/SLC51: a transporter for steroid-derived molecules. *Mol Aspects Med* 34:683-692

Ballatori N, Fang F, Christian WV, Li N, Hammond CL (2008) OSTalpha-OSTbeta is required for bile acid and conjugates steroid disposition in the intestine, kidney, and liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295:G179-G186

Bleasby K, Castle JC, Roberts CJ, Cheng C, Bailey WJ, Sina JF, Kulkarni AV, Hafey MJ, Evers R, Johnson JM, Ulrich RG, Slatter JG (2006) Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica* 36:963-988

Bossuyt X, Müller M, Hagenbuch B, Meier PJ (1996a) Polyspecific drug and steroid clearance by an organic anion transporter of mammalian liver. *J Pharmacol Exp Ther* 276:891-896

Bossuyt X, Müller M, Meier PJ (1996b) Multispecific amphipathic substrate transport by an organic anion transporter of human liver. *J Hepatol* 25:733-738

- Boyer JL, Ng OC, Anathanarayanan M, Hofmann AF, Schteingart CD, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ (1994) Expression and characterization of a functional rat liver Na<sup>+</sup> bile acid cotransport system in COS-7 cells. *Am J Physiol* 266:G382-G387
- Bronger H, König J, Kopplow K, Steiner HH, Ahmadi R, Herold-Mende C, Keppler D, Nies AT (2005) ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res* 65:11419-11428
- Burckhardt G (2012) Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). *Pharmacol Ther* 136:106-130
- Cattori V, Hagenbuch B, Hagenbuch N, Stieger B, Ha R, Winterhalter KE, Meier PJ (2000) Identification of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) as a major full-length isoform of the liver-specific transporter-1 (rlst-1) in rat liver. *FEBS Lett* 474:242-245
- Cattori V, van Montfoort JE, Stieger B, Landmann L, Meijer DK, Winterhalter KH, Meier PJ, Hagenbuch B (2001) Localization of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) in rat liver and comparison of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. *Pflugers Arch* 443:188-195
- Chen Y, Zhang S, Sorani M, Giacomini KM (2007) Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family. *J Pharmacol Exp Ther* 322:695-700
- Chesnoy S, Huang L (2000) Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:27-47
- Cheung PH, Webb CL, Disa J, Lysko PG, Feuerstein G (1996) Transient Expression of CGRP Receptor cDNA in Genetically Modified 293 Cells. *Peptide Receptors Symposium*. Ref Type: Magazine Article
- Csanaky IL, Lu H, Zhang Y, Ogura K, Choudhuri S, Klaassen CD (2011) Organic anion-transporting polypeptide 1b2 (Oatp1b2) is important for the hepatic uptake of unconjugated bile acids: Studies in Oatp1b2-null mice. *Hepatology* 53:272-281
- Cui Y, König J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D (1999) Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 55:929-937
- Cui Y, König J, Keppler D (2001) Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2. *Mol Pharmacol* 60:934-943
- Del Moral RG, Olmo A, Aguilar M, O'Valle F (1998) P-glycoprotein: a new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity. *Exp Nephrol* 6:89-97
- Döring B (2003) Klonierung und Charakterisierung eines multispezifischen Gallensäuretransporters der Rinderleber. Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Ernährung, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

- Döring B (2009) Molekular und funktionelle Charakterisierung des humanen Sodium-dependent organic anion transporter (SOAT). Dissertationsschrift am Institut für Biochemie der Ernährung, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Lauferweiler Verlag, Gießen; ISBN 978-3-8359-5592-9
- Elferink RP, Tytgat GN, Groen AK (1997) Hepatic canalicular membrane 1: The role of mdr2 P-glycoprotein in hepatobiliary lipid transport. *FASEB J* 11:19-28
- Engelhardt Wv, Breves G (2000) Physiologie der Haustiere, Enke im Hippokrates Verlag GmbH 1. Auflage. ISBN 3-7773-1429-3
- Fahrmayr C, Fromm MF, König J (2010) Hepatic OATP and OCT uptake transporters: their role for drug-drug interactions and pharmacogenetic aspects. *Drug Metab Rev* 42:380-401
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (1999) Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun* 254:497-501
- Fujiwara K, Adachi H, Nishio T, Unno M, Tokui T, Okabe M, Onogawa T, Suzuki T, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Shiiba K, Suzuki M, Kondo Y, Nunoki K, Shimosegawa T, Iinuma K, Ito S, Matsuno S, Abe T (2001) Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology* 142:2005-2012
- Gerloff T, Geier A, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Matern S, Gartung C (1999) Differential expression of basolateral and canalicular organic anion transporters during regeneration of rat liver. *Gastroenterology* 117:1408-1415
- Geyer J, Döring B, Failing K, Petzinger E (2004) Molecular cloning and functional characterization of the bovine (*Bos taurus*) organic anion transporting polypeptide Oatp1a2 (Slco1a2). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 137:317-329
- Gillette J (1963) Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanisms. *Pro Drug Res* 6:11-73
- Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, Jolicoeur E, Lee W, Leake BF, Tirona RG, Kim RB (2007) Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin Pharmacol Ther* 81:362-370
- Glaeser H, Mandery K, Sticht H, Fromm MF, König J (2010) Relevance of conserved lysine and arginine residues in transmembrane helices for the transport activity of organic anion transporting polypeptide 1B3. *Br J Pharmacol* 159:698-708
- Gritz L, Davies J (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25:179-188
- Grube M, Kock K, Oswald S, Draber K, Meissner K, Eckel L, Böhm M, Felix SB, Vogelgesang S, Jedlitschky G, Siegmund W, Warzok R, Kroemer HK (2006) Organic anion transporting

polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart. *Clin Pharmacol Ther* 80:607-620

Gui C, Hagenbuch B (2008) Amino acid residues in transmembrane domain 10 of organic anion transporting polypeptide 1B3 are critical for cholecystokinin octapeptide transport. *Biochemistry* 47:9090-9097

Gui C, Hagenbuch B (2009) Role of transmembrane domain 10 for the function of organic anion transporting polypeptide 1B1. *Protein Sci* 18:2298-2306

Gui C, Hagenbuch B (2010) Cloning/characterization of the canine organic anion transporting polypeptide 1b4 (Oatp1b4) and classification of the canine OATP/SLCO members. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 151:393-399

Hagenbuch B, Meier PJ (1994) Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 93:1326-1331

Hagenbuch B, Meier PJ (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1609:1-18

Hagenbuch B, Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447:653-665

Hagenbuch B, Stieger B (2013) The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol Aspects Med* 34:396-412

Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lubbert H, Meier PJ (1991) Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10629-10633

Hamada A, Sissung T, Price DK, Danesi R, Chau CH, Sharifi N, Venzon D, Maeda K, Nagao K, Sparreboom A, Mitsuya H, Dahut WL, Figg WD (2008) Effect of SLCO1B3 haplotype on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 14:3312-3318

Hanggi E, Grundschober AF, Leuthold S, Meier PJ, St-Pierre MV (2006) Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1. *Mol Pharmacol* 70:806-817

Hershberg R, Petrov DA (2008) Selection on codon bias. *Annu Rev Genet* 42:287-299

Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y (2004) Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 311:139-146

Hirko A, Tang F, Hughes JA (2003) Cationic lipid vectors for plasmid DNA delivery. *Curr Med Chem* 10:1185-1193

Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB (2006) Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology* 130:1793-1806

Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, Scheper RJ, Borst P, Pinedo HM, Jansen G (1999) Antifolate resistance mediates by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* 59:2532-2535

Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, Kirchgessner TG (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem* 274:37161-37168

Huang Y (2007) Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 26:183-201

Huber RD, Gao B, Sidler Pfandler MA, Zhang-Fu W, Leuthold S, Hagenbuch B, Folkers G, Meier PJ, Stieger B (2007) Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C795-C806

Iida A, Saito S, Sekine A, Mishima C, Kondo K, Kitamura Y, Harigae S, Osawa S, Nakamura Y (2001) Catalog of 258 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding three organic anion transporters, three organic anion-transporting polypeptides, and three NADH:ubiquinone oxidoreductase flavoproteins. *J Hum Genet* 46:668-683

Ishikawa T (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* 17:463-468

Jacobsen L, Calvin S, Breite D, Weijia O (2006) FuGENE® HD Transfection Reagent Provides High Levels of Protein Expression in the Human Cell Line HEK 293-EBNA and in High Five Insect Cells. *Biochemica* 1:20-21

Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ (1994) Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:133-137

Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK (2006) Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2:351-366

Kalliokoski A, Niemi M (2009) Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 158:693-705

Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K (2005) Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1\*5, SLCO1B1\*15 and SLCO1B1\*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet Genomics* 15:513-522

Keppler D, Kartenbeck J (1996) The canalicular conjugate export pump encoded by the *cmrp/cmoat* gene. *Prog Liver Dis* 14:55-67

- Kindla J, Rau TT, Jung R, Fasching PA, Strick R, Stoehr R, Hartmann A, Fromm MF, König J (2011) Expression and localization of the uptake transporters OATP2B1, OATP3A1 and OATP5A1 in non-malignant and malignant breast tissue. *Cancer Biol Ther* 11:584-591
- Knauer MJ, Urquhart BL, Meyer zu Schwabedissen HE, Schwarz UI, Lemke CJ, Leake BF, Kim RB, Tirona RG (2010) Human skeletal muscle drug transporters determine local exposure and toxicity of statins. *Circ Res* 106:297-306
- Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209:497-499
- Kobayashi D, Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I (2003) Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 306:703-708
- Kobayashi Y, Ohshiro N, Shibusawa A, Sasaki T, Tokuyama S, Sekine T, Endou H, Yamamoto T (2002) Isolation, characterization and differential gene expression of multispecific organic anion transporter 2 in Mice. *Mol Pharmacol* 62:7-14
- Koepsell H, Endou H (2004) The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* 447:666-676
- König HE, Liebich H (2005) *Anatomie der Haussäugetiere*. 3. Auflage Schattauer Verlag ISBN: 978-3-7945-2390-0
- König J (2011) Uptake transporters of the human OATP family: molecular characteristics, substrates, their role in drug-drug interactions, and functional consequences of polymorphisms. *Handb Exp Pharmacol* 1-28
- König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D (2000a) A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G156-G164
- König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D (2000b) Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J Biol Chem* 275:23161-23168
- König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediates drug resistance. *Biochem Biophys Acta* 1461:377-394
- König J, Seithel A, Gradhand U, Fromm MF (2006) Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372:432-443
- Kozak M (1986) Regulation of protein synthesis in virus-infected animal cells. *Adv Virus Res* 31:229-292
- Kozak M (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 196:947-950
- Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Schteingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW, Meier PJ (1995) Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 109:1274-1282



- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120:525-533
- Le VM, Lecureur V, Moreau A, Stieger B, Fardel O (2009) Differential regulation of drug transporter expression by hepatocyte growth factor in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 37:2228-2235
- Lee SY, Williamson B, Caballero OL, Chen YT, Scanlan MJ, Ritter G, Jongeneel CV, Simpson AJ, Old LJ (2004) Identification of the gonad-specific anion transporter SLCO6A1 as a cancer/testis (CT) antigen expressed in human lung cancer. *Cancer Immun* 4:13
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Keppler D (1994) Characterization of the ATP-dependent leucotriene C4 export carrier in mastocytoma cells. *Eur J Biochem* 220:599-606
- Letschert K, Keppler D, König J (2004) Mutations in the SLCO1B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8). *Pharmacogenetics* 14:441-452
- Li N, Cui Z, Fang F, Lee JY, Ballatori N (2007) Heterodimerization, trafficking and membrane topology of the two proteins, Ost alpha and Ost beta, that constitute the organic solute and steroid transporter. *Biochem J* 407:363-372
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas E et al. (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438:803-819
- Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, Gut I, Lathrop M, Collins R (2008) SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med* 359:789-799
- Löscher W, Potschka H (2002) Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 301:7-14
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Lu H, Choudhuri S, Ogura K, Csanaky IL, Lei X, Cheng X, Song PZ, Klaassen CD (2008) Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice: essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR. *Toxicol Sci* 103:35-45
- Lu R, Kanai N, Bao Y, Schuster VL (1996) Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT). *J Clin Invest* 98:1142-1149
- Maeda K, Ieiri I, Yasuda K, Fujino A, Fujiwara H, Otsubo K, Hirano M, Watanabe T, Kitamura Y, Kusuhashi H, Sugiyama Y (2006) Effects of organic anion transporting polypeptide 1B1 haplotype on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan, and temocapril. *Clin Pharmacol Ther* 79:427-439



Mandery K, Sticht H, Bujok K, Schmidt I, Fahrmayr C, Balk B, Fromm MF, Glaeser H (2011) Functional and structural relevance of conserved positively charged lysine residues in organic anion transporting polypeptide 1B3. *Mol Pharmacol* 80:400-406

Masuda S, Terada T, Yonezawa A, Tanihara Y, Kishimoto K, Katsura T, Ogawa O, Inui K (2006) Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H<sup>+</sup>/organic cation antiporter, kidney-specific multidrug and toxin extrusion 2. *J Am Soc Nephrol* 17:2127-2135

Meier-Abt F, Mokrab Y, Mizuguchi K (2005) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode. *J Membr Biol* 208:213-227

Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, van Herwaarden AE, Schinkel AH (2005) The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol Pharmacol* 67:1758-1764

Meyer zu Schwabedissen HE, Ware JA, Tirona RG, Kim RB (2009) Identification, expression, and functional characterization of full-length and splice variants of murine organic anion transporting polypeptide 1b2. *Mol Pharm* 6:1790-1797

Michalski C, Cui Y, Nies AT, Nuessler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Klein K, Eichelbaum M, Keppler D, König J (2002) A naturally occurring mutation in the SLC21A6 gene causing impaired membrane localization of the hepatocyte uptake transporter. *J Biol Chem* 277:43058-43063

Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, Tanemoto M, Mizutamari H, Okada M, Chaki T, Masuda S, Tokui T, Eto N, Abe M, Satoh F, Unno M, Hishinuma T, Inui K, Ito S, Goto J, Abe T (2004) Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3569-3574

Miyagawa M, Maeda K, Aoyama A, Sugiyama Y (2009) The eighth and ninth transmembrane domains in organic anion transporting polypeptide 1B1 affect the transport kinetics of estrone-3-sulfate and estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide. *J Pharmacol Exp Ther* 329:551-557

Mo W, Zhang JT (2012) human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol* 3:1-27

Monks NR, Liu S, Xu Y, Yu H, Bendelow AS, Moscow JA (2007) Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OAT. *Mol Cancer Ther* 6:587-598

Muto M, Onogawa T, Suzuki T, Ishida T, Rikiyama T, Katayose Y, Ohuchi N, Sasano H, Abe T, Unno M (2007) Human liver-specific organic anion transporter-2 is a potent prognostic factor for human breast carcinoma. *Cancer Sci* 98:1570-1576

Nakanishi T, Tamai I (2012) Genetic polymorphisms of OATP transporters and their impact on intestinal absorption and hepatic disposition of drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* 27:106-121

Ng PC, Henikoff JG, Henikoff S (2000) PHAT: a transmembrane-specific substitution matrix. Predicted hydrophobic and transmembrane. *Bioinformatics* 16:760-766

Niemi M, Arnold KA, Backman JT, Pasanen MK, Godtel-Armbrust U, Wojnowski L, Zanger UM, Neuvonen PJ, Eichelbaum M, Kivisto KT, Lang T (2006) Association of genetic polymorphism in ABCC2 with hepatic multidrug resistance-associated protein 2 expression and pravastatin pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics* 16:801-808

Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ (2011) Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev* 63:157-181

Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, Fromm MF, Neuvonen M, Kyrklund C, Backman JT, Kerb R, Schwab M, Neuvonen PJ, Eichelbaum M, Kivisto KT (2004) High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics* 14:429-440

Nies AT, Keppler D (2007) The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 453:643-659

Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, Takane H, Irie S, Kusuhara H, Urasaki Y, Urae A, Higuchi S, Otsubo K, Sugiyama Y (2003) Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 73:554-565

Noe B, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ (1997) Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10346-10350

Noe J, Portmann R, Brun ME, Funk C (2007) Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3. *Drug Metab Dispos* 35:1308-1314

Nomura T, Chang HY, Lu R, Hankin J, Murphy RC, Schuster VL (2005) Prostaglandin signaling in the renal collecting duct: release, reuptake, and oxidation in the same cell. *J Biol Chem* 280:28424-28429

Nomura T, Lu R, Pucci ML, Schuster VL (2004) The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase. *Mol Pharmacol* 65:973-978

Nozawa T, Nakajima M, Tamai I, Noda K, Nezu J, Sai Y, Tsuji A, Yokoi T (2002) Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and functional analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 302:804-813

Nozawa T, Suzuki M, Yabuuchi H, Irokawa M, Tsuji A, Tamai I (2005) Suppression of cell proliferation by inhibition of estrone-3-sulfate transporter in estrogen-dependent breast cancer cells. *Pharm Res* 22:1634-1641

- Otsuka M, Yasuda M, Morita Y, Otsuka C, Tsuchiya T, Omote H, Miriyama Y (2005) Identification of essential amino acid residues of the NorM Na<sup>+</sup>/multidrug antiporter in *Vibrio Parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 187:1552-1558
- Oude Elferink RP, Paulusma CC (2007) Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch* 453:601-610
- Pacyniak E, Hagenbuch B, Klaassen CD, Lehman-McKeeman L, Guo GL (2011) Organic anion transporting polypeptides in the hepatic uptake of PBDE congeners in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 257:23-31
- Pacyniak E, Roth M, Hagenbuch B, Guo GL (2010) Mechanism of polybrominated diphenyl ether uptake into the liver: PBDE congeners are substrates of human hepatic OATP transporters. *Toxicol Sci* 115:344-353
- Palmer TD, Hock RA, Osborne WR, Miller AD (1987) Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine deaminase gene in diploid skin fibroblasts from an adenosine deaminase-deficient human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1055-1059
- Pasanen MK, Fredrikson H, Neuvonen PJ, Niemi M (2007) Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 82:726-733
- Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M (2006) SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet Genomics* 16:873-879
- Pasanen MK, Neuvonen PJ, Niemi M (2008) Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics* 9:19-33
- Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter BF, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Oude Elferink RP (1997) A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 25:1539-1542
- Peters IR, Peeters D, Helps CR, Day MJ (2007) Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. *Vet Immunol Immunopathol* 117:55-66
- Petzinger E, Geyer J (2006) Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372:465-475
- Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, Klenk U, Folkers G, Meier PJ (2002) Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol Endocrinol* 16:2283-2296
- Pizzagalli F, Varga Z, Huber RD, Folkers G, Meier PJ, St-Pierre MV (2003) Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3902-3912
- Plotkin JB, Kudla G (2011) Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet* 12:32-42

- Poller B, Drewe J, Krahenbuhl S, Huwyler J, Gutmann H (2010) Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 30:63-70
- Prinzinger C (2015) Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes. Dissertationsschrift am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, Gießen ISBN: 978-3-8359-6283-5
- Robbins AK, Horlick RA (1998) Macrophage scavenger receptor confers an adherent phenotype to cells in culture. *Biotechniques* 25:240-244
- Rocha EP (2004) Codon usage bias from tRNA's point of view: redundancy, specialization, and efficient decoding for translation optimization. *Genome Res* 14:2279-2286
- Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B (2012) OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 165:1260-1287
- Sasaki M, Suzuki H, Ito K, Abe T, Sugiyama Y (2002) Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J Biol Chem* 277:6497-6503
- Schiffer R, Neis M, Holler D, Rodriguez F, Geier A, Gartung C, Lammert F, Dreuw A, Zwadlo-Klarwasser G, Merk H, Jugert F, Baron JM (2003) Active influx transport is mediated by members of the organic anion transporting polypeptide family in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 120:285-291
- Schmidt S, Moncada M, Burger S, Geyer J (2015) Expression, sorting and transport studies for the orphan carrier SLC10A4 in neuronal and non-neuronal cell lines and in *Xenopus laevis* oocytes. *BMC Neurosci* 16:35
- Schröder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3
- Schuster VL (2002) Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:633-647
- Schwarz UI, Meyer zu Schwabedissen HE, Tirona RG, Suzuki A, Leake BF, Mokrab Y, Mizuguchi K, Ho RH, Kim RB (2011) Identification of novel functional organic anion-transporting polypeptide 1B3 polymorphisms and assessment of substrate specificity. *Pharmacogenet Genomics* 21:103-114
- Sekine T, Cha SH, Tsuda M, Apiwattanakul N, Nakajima N, Kanai Y, Endou H (1998) Identification of multispecific organic anion transporter 2 expresses predominantly in the liver. *FEBS Lett* 429:179-182

Seward DJ, Koh AS, Boyer JL, Ballatori N (2003) Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta. *J Biol Chem* 278:27473-27482

Shin HJ, Anzei N, Enomoto A, He X, Kim dK, Endou H, Kanai Y (2007) Novel liver-specific organic anion transporter OAT7 that operates the exchange of sulfate conjugates for short chain fatty acid butyrate. *Hepatology* 45:1046-1055

Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP, Sugiyama Y (2003) Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 304:610-616

Smith NF, Acharya MR, Desai N, Figg WD, Sparreboom A (2005) Identification of OATP1B3 as a high-affinity hepatocellular transporter of paclitaxel. *Cancer Biol Ther* 4:815-818

St-Pierre MV, Hagenbuch B, Ugele B, Meier PJ, Stallmach T (2002) Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1856-1863

Stieger B, Meier PJ (1998) Bile acid and xenobiotic transporters in liver. *Curr Opin Cell Biol* 10:462-467

Sun W, Wu RR, van Poelje PD, Erion MD (2001) Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 283:417-422

Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, Abe M, Satoh F, Unno M, Nunoki K, Suzuki M, Hishinuma T, Goto J, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T (2003) Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Mol Endocrinol* 17:1203-1215

Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A (2000) Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 273:251-260

Tamai I, Nozawa T, Koshida M, Nezu J, Sai Y, Tsuji A (2001) Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm Res* 18:1262-1269

Terada T, Masuda S, Asaka J, Tsuda M, Katsura T, Inui K (2006) Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution of rat H<sup>+</sup>/organic cation antiporter MATE1. *Pharm Res* 23:1696-1701

Thermo Fisher, Data sheet OATP2-AB:

<http://www.thermofisher.com/antibody/product/OATP2-Antibody-clone-ESL-Monoclonal/MA3-934>

Tian X, Zamek-Gliszczynski MJ, Li J, Bridges AS, Nezasa K, Patel NJ, Raub TJ, Brouwer KL, (2008) Multidrug resistance-associated protein 2 is primarily responsible for the biliary excretion of fexofenadine in mice. *Drug Metab Dispos* 36:61-64

Tirona RG, Leake BF, Merino G, Kim RB (2001) Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 276:35669-35675

Tirona RG, Leake BF, Wolkoff AW, Kim RB (2003) Human organic anion transporting polypeptide-C (SLC21A6) is a major determinant of rifampin-mediated pregnane X receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 304:223-228

Toyoda Y, Hagiya Y, Adachi T, Hoshijima K, Kuo MT, Ishikawa T (2008) MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions. *Xenobiotica* 38:833-862

Treiber A, Schneider R, Hausler S, Stieger B (2007) Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metab Dispos* 35:1400-1407

van de Steeg E, Wagenaar E, van der Kruijsen CM, Burggraaff JE, de Waart DR, Elferink RP, Kenworthy KE, Schinkel AH (2010) Organic anion transporting polypeptide 1a/1b-knockout mice provide insights into hepatic handling of bilirubin, bile acids, and drugs. *J Clin Invest* 120:2942-2952

van Herwaarden AE, Wagenaar E, Merino G, Jonker JW, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH (2007) Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol Cell Biol* 27:1247-1253

Vavricka SR, Jung D, Fried M, Grutzner U, Meier PJ, Kullak-Ublick GA (2004) The human organic anion transporting polypeptide 8 (SLCO1B3) gene is transcriptionally repressed by hepatocyte nuclear factor 3beta in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 40:212-218

Wang H, Lee EW, Cai X, Ni Z, Zhou L, Mao Q (2008a) Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence. *Biochemistry* 47:13778-13787

Wang P, Hata S, Xiao Y, Murray JW, Wolkoff AW (2008b) Topological assessment of oatp1a1: a. 12-transmembrane domain integral membrane protein with three N-linked carbohydrate chains. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:G1052-G1059

Wang W, Seward DJ, Li L, Boyer JL, Ballatori N (2001) Expression cloning of two genes that together mediate organic solute and steroid transport in the liver of a marine vertebrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9431-9436

Weaver YM, Hagenbuch B (2010) Several conserved positively charged amino acids in OATP1B1 are involved in binding or translocation of different substrates. *J Membr Biol* 236:279-290

Williams R (1959) Detoxication mechanism. The metabolism of drugs and allied organic compound. In: 2<sup>nd</sup> edition edn. London: Chapman and Hall Ltd.

Xu J, Liu Y, Yang Y, Bates S, Zhang JT (2004) Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J Biol Chem* 279:18781-18789

Yamaguchi H, Okada M, Akitaya S, Ohara H, Mikkaichi T, Ishikawa H, Sato M, Matsuura M, Saga T, Unno M, Abe T, Mano N, Hishinuma T, Goto J (2006) Transport of fluorescent chenodeoxycholic acid via the human organic anion transporters OATP1B1 and OATP1B3. *J Lipid Res* 47:1196-1202

Yokoo S, Yonezawa A, Masuda S, Fukatsu A, Katsura T, Inui K (2007) Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 74: 477-487

Zaher H, Meyer zu Schwabedissen HE, Tirona RG, Cox ML, Obert LA, Agrawal N, Palandra J, Stock JL, Kim RB, Ware JA (2008) Targeted disruption of murine organic anion-transporting polypeptide 1b2 (Oatp1b2/Slco1b2) significantly alters disposition of prototypical drug substrates pravastatin and rifampin. *Mol Pharmacol* 74:320-329

Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, Li Y (2008) Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem* 15:1981-2039

Zimniak P (1993) Dubin-Johnson and Roter syndromes: molecular basis and pathogenesis. *Semin Liver Dis* 13:248-260



## 9 ANHANG

Anhang Tab. 1: Substrate, welche von dem humanen OATP1B1 transportiert werden

Substrate	OATP1B1	Referenzen
	K <sub>m</sub> Werte (µM)	
ACU154		Takada et al. 2004
Atorvastatin	12	Kameyama et al. 2005
	10	Lau et al. 2007
Atrasentan		Katz et al. 2006
Bamet-R2	10	Briz et al. 2002
Bamet-UD2	10	Briz et al. 2002
Benzylpenicillin		Tamai et al. 2000
BDE47	0,31	Pacyniak et al. 2010
BDE99	0,91	Pacyniak et al. 2010
BDE153	1,91	Pacyniak et al. 2010
Bilirubin	0,01	Briz et al. 2003
Bisglucuronosyl bilirubin	0,3	Cui et al. 2001
BNP1350		Oostensorp et al. 2009
Bosentan	44	Treiber et al. 2007
BQ-123		Kullak-Ublick et al. 2001
Bromosulphophthalein	0,1-0,3	Cui et al. 2001, Kullak-Ublick et al. 2001
Caspofungin		Sandhu et al. 2005
Cefazolin	20.800	Nakakariya et al. 2008
Cefditoren	3.450	Nakakariya et al. 2008
Cefoperazone	4.840	Nakakariya et al. 2008
Cerivastatin	4	Shitara et al. 2003
CDCA-NBD	1,5	Yamaguchi et al. 2006
Cholat	11	Cui et al. 2001
CGamF	7,9	Annaert et al. 2010
DADLE		Nozawa et al. 2003
Darunavir		Hartkoorn et al. 2010
Dehydroepiandrosteron-3-sulfat	22	Abe et al. 1999,2001, Hsiang et al. 1999, Cui et al. 2001, Kullak-Ublick et al. 2001
Demethylphalloin	17	Meier-Abt et al. 2004
Enalapril	262	Liu et al. 2006
Estradiol-17β-glucuronid	4-24	Abe et al. 1999, Tamai et al. 2000,2001, König et al. 2000b, Cui et al. 2001, Kullak-Ublick et al. 2001, Nakai et al. 2001, Hirano et al. 2004
Estron-3-sulfat	0,5	Hirano et al. 2004
	12,5	Cui et al. 2001
	0,09 und 5,4	Tamai et al. 2001
	0,23 und 45	Noe et al. 2007
Ezetimib Glucuronid		Oswald et al. 2008
Fluorescein		Gui et al. 2010
Fluorescein methotrexat	3,8	Gui et al. 2010
Fluvastatin	1,4-3,5	Kopplow et al. 2005, Noe et al. 2007



Gimatecan		Oostendorp et al. 2009
Glycocholat		Kullak-Ublick et al. 2001
Glycoursodeoxycholat		Maeda et al. 2006b
Hydroxyurea		Walker et al. 2001
Leukotrien C4		Abe et al. 1999
Leukotrien E4		Abe et al. 1999
Lopinavir		Hartkoorn et al. 2010
Mesalazin	55	König 2011
Methotrexat		Abe et al. 2001
Microcystein	7	Fischer et al. 2005
Monoglyucuronosyl bilirubin	0,1	Cui et al. 2001
Nafcillin	1.110	Nakakariya et al. 2008
Olmesartan	13-43	Nakagomi-Hagihara et al. 2006, Yamada et al. 2007
Phalloidin	17-39	Fehrenbach et al. 2003, Meier-Abt et al. 2004
Pitavastatin	3-4	Hirano et al. 2004, Fujino et al. 2005
Pravastatin	14-34	Hsiang et al. 1999, Nakai et al. 2001, Sasaki et al. 2002
PG E <sub>2</sub>		Abe et al. 1999, Tamai et al. 2000, Kullak-Ublick et al. 2001
Rifampicin	2-13	Vavricka et al. 2002, Tirona et al. 2003
Ro 48-5033	60	Treiber et al. 2007
Rosuvastatin	9	Ho et al. 2006
S-8921G	1,93	Sakamoto et al. 2008
Saquinavir		Hartkoorn et al. 2010
Simvastatinsäure		Pasanen et al. 2006
SN-38		Nozawa et al. 2005
Taurocholat	10-34	Abe et al. 1999, 2001; Hsiang et al. 1999, Cui et al. 2001, Kullak-Ublick et al. 2001
Tauroursodeoxycholat	7,5	Maeda et al. 2006b
Temocapril		Maeda et al. 2006a
Thromboxan B2		Abe et al. 1999
Thyroxin (T4)	3	Abe et al. 1999
Torasemid	6,2	Vormfelde et al. 2008, Werner et al. 2008
TR-14035	7,5	Tsuda-Tsukimoto et al. 2006
Trijodthyronin (T3)	3	Abe et al. 1999
Troglitazonsulfat		Nozawa et al. 2004b
Valsartan	1,4	Yamashiro et al 2006

Anhang Tab. 2: Substrate, welche von dem humanen OATP1B3 transportiert werden

Substrat	OATP1B3	Referenzen
	K <sub>m</sub> Wert (μM)	
Amanitin	4	Letscher et al. 2006
Atrasentan		Katz et al. 2006
Benzylpenicillin (Penicillin G)		Letscher et al. 2006
BDE47	0,41	Pacyniak et al. 2010
BDE99	0,7	Pacyniak et al. 2010
BDE153	1,66	Pacyniak et al. 2010
Bilirubin	0,04	Briz et al. 2003
Bosentan	141	Treiber et al. 2007
BQ-123		Kullak-Ublick et al. 2001
Bromosulfophthalein	0,4-6	Kullak-Ublick et al. 2001
Cefadroxil	4.150	Nakakariya et al. 2008
Cefazolin	3.890	Nakakariya et al. 2008
Cefditoren	5.870	Nakakariya et al. 2008
Cefmetazol	706	Nakakariya et al. 2008
Cefoperazon	1.950	Nakakariya et al. 2008
Cefalexin	1.190	Nakakariya et al. 2008
CDCA-NBD	0,5	Yamaguchi et al. 2006
Cholat	42	Briz et al. 2006
Cholecystokinin Oktapeptid (CCK8)	4-11	Ismair et al. 2001, Hirano et al. 2004
CGamF	2,2	Annaert et al. 2010
Dehydroepiandrosteron-3-sulfat		König et al. 2000a, Cui et al. 2001, Kullak-Ublick et al. 2001
Deltorphin II		Kullak-Ublick et al. 2001
Demethylphalloin	8	Meier-Abt et al. 2004
Diclofenac		Kindla et al. 2011
Digoxin		Kullak-Ublick et al. 2001
Docetaxel		Smith et al. 2005
Enalapril		Liu et al. 2006
Epicatchin gallat	34	Roth et al. 2011b
Epigallocatechin gallat	13	Roth et al. 2011b
Erythromycin		Franke et al. 2008
Estradiol-17β-glucuronid	5-25	König et al. 2000a, Cui et al. 2001, Hirona et al. 2004
Estron-3-sulfat		Kullak-Ublick et al. 2001, Nozawa et al. 2004b, Nozawa et al. 2005
Fexofenadin	108	Shimizu et al. 2005
Fluorescein		Gui et al. 2010
Fluorescein methotrexat	7,9	Gui et al. 2010
Fluo-3, pentoammonium Salz	6,8	Baldes et al. 2006
Flutax-2		Gui et al. 2010
Fluvastatin	7	Kopplow et al. 2005
Gluthation	4500	Briz et al. 2006
Glycocholot	43	Kullak-Ublick et al. 2001, Briz et al. 2006
Glycoursodeoxycholot	24,7	Maeda et al. 2006b

Hydroxyurea		Walker et al. 2011
Imatinib		Hu et al. 2008
Leukotrien C4		König et al. 2000a, Kullak-Ublick et al. 2001
Mesalazin	77	König 2011
Methotrexat	25-39	Abe et al. 2001
Microcystin	1,2-9	Fischer et al. 2005, Komatsu et al. 2007
Monoglyucuronosyl bilirubin	0,5	Cui et al. 2001
Mycophenolsäure-7-O-glucuronid	114	Picard et al. 2010
Nafcillin	73	Nakakariya et al. 2008
Olmesartan	44-72	Nakagomi-Hagihara et al. 2006, Yamada et al. 2007
Ouabain		Kullak-Ublick et al. 2001
Paclitaxel	7	Smith et al. 2005
Phalloidin	8	Meier-Abt et al. 2004
Pitavastatin	3-4	Hirano et al. 2004, Fujino et al. 2005
Rifampicin	2	Vavricka et al. 2002, Tirona et al. 2003
Ro 48-5033	166	Treiber et al. 2007
Rosuvastatin	10	Ho et al. 2007
S-8921G	1,88	Sakamoto et al. 2008
Saquinavir		Hartkoorn et al. 2010
Taurocholat	6-112	Abe et al. 2001, Kullak-Ublick et al. 2001, Letscher et al. 2004, Briz et al. 2006
Taurochenodeoxycholat		Briz et al. 2006
Taurodeoxycholat		Briz et al. 2006
Tauroursodeoxycholat	16	Maeda et al. 2006b
Telmisartan	1	Ishiguro et al. 2006
Thyroxin (T4)		Kullak-Ublick et al. 2001
TR-14035	5,3	Tsuda-Tsukimoto et al. 2006
Triiodthyronin (T3)	6	Abe et al. 2001, Kullak-Ublick et al. 2001
Valsartan	18	Yamashiro et al. 2006

## 10 DANKSAGUNGEN

Eine Arbeit wie diese ist ohne die Unterstützung und Mithilfe einiger Personen kaum möglich, sodass ich mich an dieser Stelle bei eben jenen Menschen bedanken möchte.

Mein erster Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Joachim Geyer, der es mir überhaupt ermöglicht hat an diesem Institut meine Dissertation machen zu können. In der ganzen Zeit hatte er immer ein offenes Ohr und hat selbst mitgefiebert und Ideen und Anregungen eingebracht, gerade in problematischen Zeiten.

Prof Dr. Dr. h.c. Martin Kramer und Prof. Dr. Sabine Tacke mitsamt ihrem Team der Klinik für Kleintiere der JLU möchte ich für die Bereitstellung der Leberbiopsieproben danken.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Wolfgang Clauss und insbesondere auch an Dr. Katrin Richter aus dem Institut für Tierphysiologie für die Bereitstellung der *X. laevis* Oozyten.

Ich danke der Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung e.V. für die finanzielle Förderung meines Projektes.

Vielen Dank an Prof. Dr. Bruno Stieger für die Bereitstellung des Antikörpers „K23“

Ein Dankeschön an mein „erstes“ Doktorandenzimmer Jasmin Kranz und Stephanie Schmidt, die mich in meinen ersten Wochen und Monaten unterstützt und mir die Eingewöhnungszeit erleichtert haben und vor allem auch an Clarissa Prinzinger, die mich in die molekularen Methoden eingearbeitet hat.

Meinem „zweiten“ Zimmer (Katharina Bakhaus, Julia Aretz und Sabrina Elmshäuser) bin ich sehr dankbar dafür, dass sie mich mit offenen Armen aufgenommen haben und mir somit nicht nur in fachlichen Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen, sondern mir auch zahlreiche lustige und schöne Momente sowohl im Institut, als auch abseits davon beschert haben und dies immernoch tun. In diesem Rahmen sei auch Simone Kraut erwähnt, die die Runde um ein institutsexternes Mitglied erweitert.

Barbara Döring danke ich für die vielen wertvollen Diskussionen und Ratschläge rund um fachliche Fragen zu meiner Arbeit und hier natürlich auch für ihre großartige Vorarbeit zu dem bovinen Oatp1b4. Auch hier freue ich mich sehr, dass wir uns weiterhin abseits des Instituts sehen.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an Klaus Schuh richten, der in der Zellkultur eine großartige Arbeit leistet und trotz vieler Tiefschläge mir immer geholfen hat meine Zellen wieder aufzupeppeln und nie zu verzweifeln.

Danke an Regina Leidolf und Anita Neubauer, die mich, sofern sie etwas Zeit in ihrem vollen Terminkalender freischaufeln konnten, bei dem einen oder anderen Versuch unterstützt haben und auch immer am Erfolg eben dieser mitfiebern.

Auch bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts möchte mich für die schöne Zeit bedanken, für die ein oder andere anregende Diskussion sowohl fachlicher als auch privater Natur und dafür, dass sich immer eine helfende Hand findet. Hier sei stellvertretend Simon Müller erwähnt, der zu einer Zeit in der ich nicht mehr täglich im Institut sein konnte sich zusammen mit Klaus Schuh um meine Zellen gekümmert hat.

Zu guter letzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, die mich in meinem Vorhaben diese Arbeit zu machen von Anfang an unterstützt haben und mir zur Seite gestanden haben, auch als die Finanzierung zu Beginn nicht gesichert war. Ohne diesen Rückhalt wäre es mir nicht möglich gewesen es bis hierher zu schaffen.

## ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

**„Hepatische Arzneistofftransporter der Oatp1b-Subfamilie von Haus- und Nutztieren:  
Klonierung, Polymorphismenanalyse und funktionelle Charakterisierung“**

Selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Jana Bartholomeyzik



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6641-3



9 783835 196413